

del fruto de capsicum

Juan Carlos Tapia Picazo^{1*}, Eleazar Escamilla Silva², Adrián Bonilla Petriciolet¹.

¹Instituto Tecnológico de Aguascalientes, Departamento de Ingeniería Química,
Av. López Mateos 1801, C.P. 20256, Aguascalientes, Ags. México.

²Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Química, Av. Tecnológico y García Cubas,
C.P. 38040, Celaya, Gto. México.

Isolation of Capsaicinoids from the capsicum fruit

Aïllament de capsaicinoids directament del fruit de Capsicum

Recibido: 14 de marzo de 2007; revisado: 12 de febrero de 2008; aceptado: 23 de abril de 2008

RESUMEN

Se presenta una metodología experimental a nivel laboratorio para optimizar la extracción de capsaicinoides directamente del fruto de *capsicum*. La herramienta experimental y el tipo de pruebas realizadas permiten su escalamiento a nivel piloto, además de que muestran en orden de magnitud el impacto de las variables sobre la recuperación de capsaicinoides. Se utilizó una técnica por cromatografía de líquidos para determinar la cantidad de capsaicinoides extraídos en las diferentes pruebas realizadas. Posteriormente, para la mezcla solvente-capsaicinoides definida como óptima en la etapa de extracción del fruto de Chile, se determinan condiciones de purificación a nivel piloto mediante una columna de platos oscilantes tipo Karr basados en el trabajo desarrollado por Tapia y col. (1993). El proceso de purificación permitió eliminar el 40 % de las impurezas presentes, a un bajo costo respecto a los métodos utilizados actualmente.

Palabras clave: Aislamiento de Capsaicinoides. Columna Karr. Purificación de Oleorresina.

SUMMARY

An experimental methodology is presented at laboratory level to optimize the capsaicinoids extraction directly from the capsicum fruit. The experimental tool and tests performed allow their scaling at pilot level, besides that they show in order of magnitude the impact of the variables on the *capsaicinoids* recovery. A technique based on liquid chromatography was used to determine the

capsaicinoids content extracted in the different tests performed. For the mixture solvent-*capsaicinoids* identified as the optimum in the extraction stage, purification conditions at pilot level were obtained using a Karr-reciprocating extraction column based on the previous work developed by Tapia et al. (1993). The purification process allows eliminate the 40 % of the impurities presented, at very low cost respect to the available methods.

Key words: Capsaicinoids isolation, Karr column, Oleorresin purification.

RESUM

Es presenta una metodologia experimental a nivell laboratori per optimitzar l'extracció de capsaicinoides directament del fruit de *Capsicum*. Les eines experimentals i el tipus de proves realitzades permeten escalar-ho a nivell de planta pilot, i a més mostren l'ordre de magnitud del impacte de les variables sobre la recuperació de capsaicinoides. S'ha emprat una tècnica de cromatografia de líquids per determinar la quantitat de capsaicinoides extrets en les diferents proves realitzades. Posteriorment es determinen, per a la mescla solvent-capsaicinoides definida com òptima en l'etapa d'extracció del fruit de Xile, les condicions de purificació a nivell de planta pilot mitjançant una columna de plats oscil·lants tipus Karr basats en el treball desenvolupat per Tapia i col. (1993). El procés de purificació permeté eliminar el 40% de les impureses presents a un baix cost respecte als mètodes utilitzats actualment.

Mots clau: Aïllament de Capsaicinoides. Columna Karr. Purificació d'Oleoreïna.

INTRODUCCIÓN

En 1846 por primera vez se cristalizó y nombró capsaicina al compuesto responsable del sabor picante de los frutos de Chile o *capsicum*. Pero fue hasta 1923 cuando se determinó su fórmula química como ácido 8-metil-6-nonaico de vainillilamina. Nombre según la IUPAC 8-metil-N-vainillil-6-nonenamida. Gracias al desarrollo de técnicas analíticas, como la cromatografía de líquidos de alta resolución, se ha podido descubrir que además de la capsaicina, en los frutos existen otros compuestos análogos con sabor picante, los cuales en conjunto son denominados capsaicinoides (Rodríguez, M. 1989). Se reconocen cinco capsaicinoides como los de mayor actividad biológica: capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y la norcapsaicina. De los anteriores el que predomina en los frutos es la capsaicina (aproximadamente un 90 % del total de capsaicinoides). En la Figura 1 se muestra la estructura química de los diferentes capsaicinoides.

Existen tres técnicas para la obtención de capsaicinoides:

- A través de extracciones directamente de la planta.
- Síntesis orgánica, frecuentemente muy sofisticada.
- Cultivo de células vegetales.

Los capsaicinoides son comercializados como un extracto impuro denominado «oleorresina», muy utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. En la industria alimentaria son usados como condimentos alimenticios que provocan una mayor aceptación del producto y además por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Jones y col. 1997; Dorantes y col. 2000). Para la industria farmacéutica representan un mercado potencial, por los efectos que han mostrado tener como anestésico local y en tratamientos reumáticos (Long, A.C., Medeiros, D.M. 2001). El factor limitante para el comercio de la oleorresina del *capsicum*, es su alto contenido de aceites provenientes de las semillas, que provocan con el tiempo enranciamiento en el extracto y una pérdida de capsaicinoides. Como consecuencia de lo anterior se ha intentado su purificación mediante técnicas cromatográficas, sin embargo, el hacerlo provoca una disminución en el rendimiento del proceso y que los costos de producción se eleven. La oleorresina es comercializada en solución de aceite o agua con porcentajes de capsaicinoides entre el 1 y 40 % (Fuentes: Asian Herbex y Hebei Tianxu 2007). Debido a la baja solubilidad de los capsaicinoides en agua, para la preparación de soluciones acuosas se adicionan pequeñas cantidades de solventes orgánicos y emulsificantes. Por otra parte, la producción de los capsaicinoides por síntesis química es un proceso costoso e involucra un gran número de pasos, obteniendo en el producto final una mezcla de isómeros con propiedades cuya actividad es diferente a las de los capsaicinoides. Finalmente mediante técnicas de cultivo de células vegetales, no ha sido posible obtener rendimientos de producción de capsaicinoides que permitan considerar este proceso como económicamente viable para su implementación a nivel industrial.

La obtención de los capsaicinoides en forma cristalina a partir de la extracción directa del fruto de *capsicum* implica un gran número de pasos que además de ser poco eficientes son muy costosos, la mayoría de los procedimientos definidos contienen una etapa inicial de aislamiento mediante la práctica de una serie de extracciones con un solvente soluble en agua sobre una determinada cantidad de Chile preparado. La preparación del Chile consiste en su molienda y secado por medio de congelación durante

varios días, removiendo los cristales de agua por filtración, posteriormente se efectúa el aislamiento de los capsaicinoides en forma de oleorresina impura mediante varias extracciones con un solvente, se realiza una etapa de purificación de la oleorresina, a través de la eliminación de impurezas mediante precipitación utilizando sales de bario en una serie de etapas extractivas (Nelson, E. K. 1910), finalmente se implementa una etapa de cristalización para la presentación final del producto. En la bibliografía se ha observado que las metodologías utilizadas para la implementación de cada una de las etapas de separación descritas son muy variadas, la primera etapa es la que presenta una mayor similitud para todos los procedimientos encontrados, a pesar de ello, el número y condiciones para las extracciones no es el mismo en cada técnica encontrada. Algunos autores hacen énfasis en que si la etapa de aislamiento de la separación no se produce de una manera eficiente los resultados finales no serán satisfactorios (Susuki, T., Iwai, K. 1984). En el aislamiento de los capsaicinoides se aprovecha la característica de la alta solubilidad de los mismos en solventes orgánicos, por lo que se establece la extracción líquido-líquido como una operación unitaria potencialmente factible.

En este trabajo se realizó un estudio sobre la primera etapa del proceso de obtención de capsaicinoides directamente del fruto de *capsicum*, con el propósito de caracterizar, robustecer y definir las bases para el escalamiento a nivel piloto de las condiciones óptimas obtenidas. Para la optimización de las condiciones se determinó en orden de magnitud, el impacto de las principales variables de esta etapa de separación sobre la extracción de los capsaicinoides del fruto de *capsicum*. Posteriormente para purificar las mezclas solvente-capsaicinoides que se obtienen en la etapa de extracción, mediante un proceso a nivel piloto de menor costo respecto a los sistemas tradicionales implementados actualmente, se utilizó una columna de platos oscilantes tipo Karr, basados en los resultados obtenidos por Tapia y col. en 1993. El trabajo tomado como referencia presenta las variables y condiciones óptimas de proceso para el aislamiento de capsaicinoides de un medio de cultivo de células de *capsicum* utilizando una columna de extracción de este tipo, implementando una estrategia experimental similar a la que se utilizó en el presente trabajo para la extracción directa del fruto de *capsicum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción directa del fruto de *capsicum*

Inicialmente se realiza la preparación del fruto del Chile mediante su molienda, la cual, se realizó con una licuadora, posteriormente se removió la humedad a través de congelamiento durante 2 o 3 días. Las variedades de Chile que se utilizaron en las pruebas son serrano y manzano (pro-

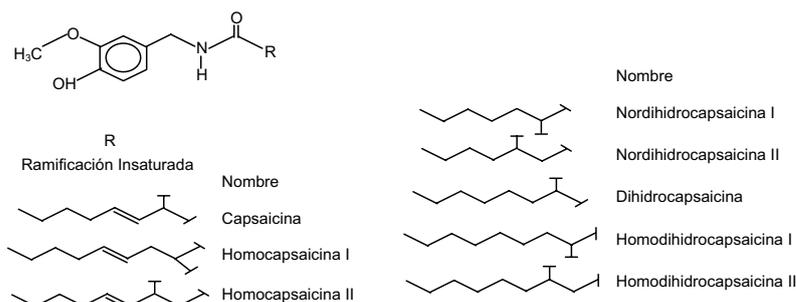


Figura 1. Estructura química de los diferentes capsaicinoides.

ductos típicos de la región central de México). Para realizar las pruebas se definió utilizar acetona como solvente de extracción, se pesa una cantidad del chile molido y seco, se coloca en un recipiente con la cantidad de acetona correspondiente a cada prueba, la mezcla se coloca en un baño maría y se mantiene a una determinada temperatura, se agita por un tiempo establecido inicialmente por medio de un agitador de hélice controlando su velocidad, posteriormente se filtra en un embudo buchner y si es necesario se realiza otra extracción sobre la muestra de chile utilizando la misma acetona o se realizan el número de extracciones que se tengan planeadas para cada prueba siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se toma una muestra de acetona de 50 ml, la cual se evapora en un rotavapor para finalmente cuantificar la concentración de capsaicinoides extraídos, utilizando cromatografía de líquidos (HPLC). En la Figura 2 se muestra la secuencia de las pruebas.

Cuantificación por HPLC

La valoración de las extracciones realizadas sobre los frutos de *capsicum* a través de acetona, se realiza por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (Attuquayefio, V. K. 1987, Heresch, F. 1979). La muestra de 50 ml que se toma al final de cada prueba de extracción se evapora en un rotavapor a vacío, los residuos de la evaporación se disuelven en metanol grado cromatografía, las muestras se pasan por un cartucho C18 SEP-PAK, lo anterior se debe a que los residuos son grasosos y por consiguiente antes de introducir la muestra al cromatógrafo se requiere de un tratamiento preliminar, esto con el fin de evitar daños a la columna cromatográfica que se utiliza para la valoración. La coloración de los residuos varía de acuerdo a la variedad de chile que se esté utilizando. La muestra tratada se valora por HPLC. Un Cromatograma típico de las muestras se presenta en la Figura 3.

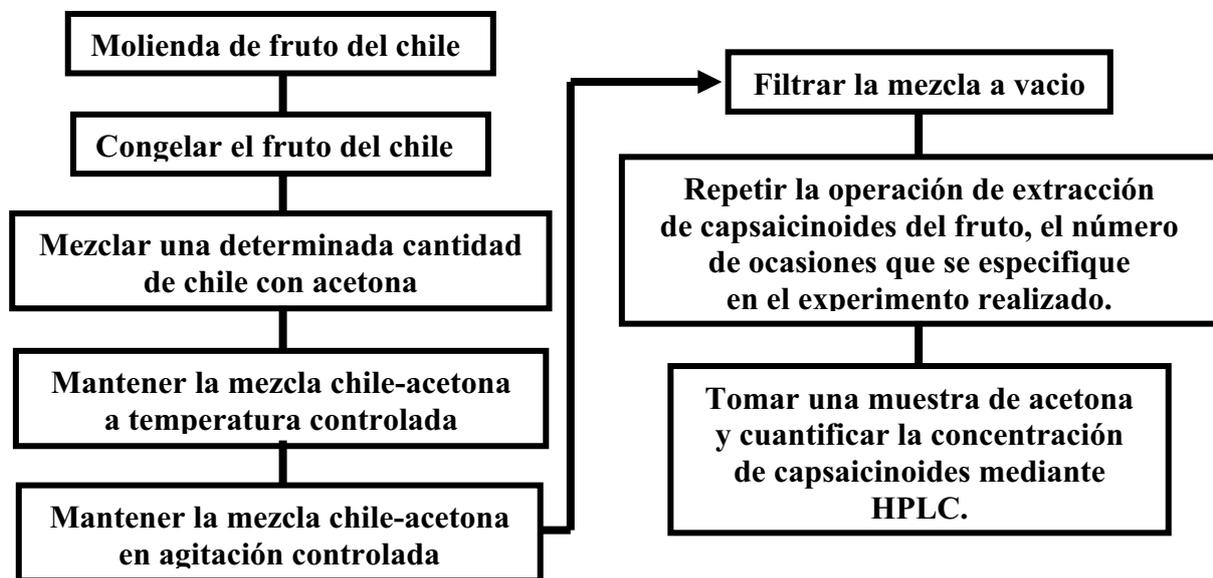


Figura 2. Procedimiento para la extracción de capsaicinoides del fruto de *capsicum*.

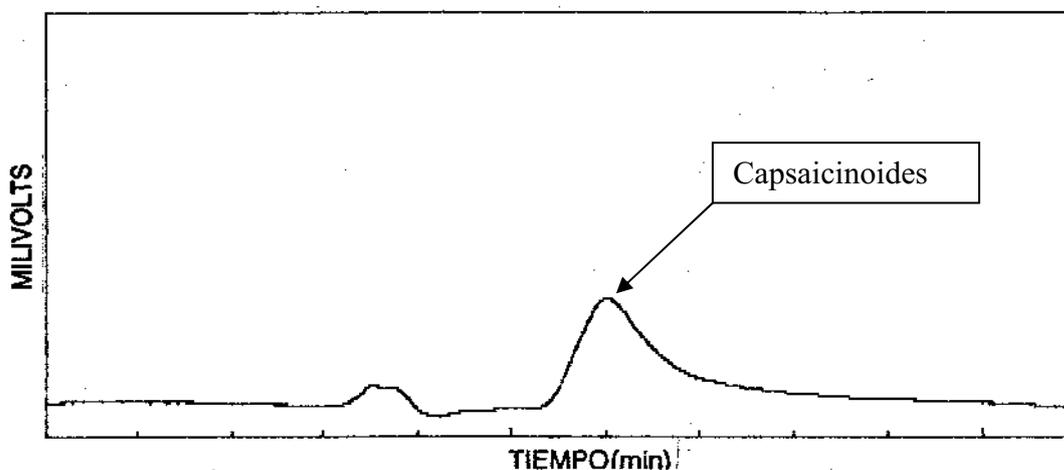


Figura 3. Cromatograma típico de las muestras de extracto de acetona.

Características del equipo y condiciones de operación utilizadas:

Equipo: HPLC Cecil Instruments CE-2010, Columna Econosphere C-18 (4,6 × 150 mm).
Detector de luz ultravioleta Cecil Instruments CE-2212 a 280 nm conectado a una interface inteligente PE Nelson 950.
Fase móvil. Metanol/agua (70/30) v/v, con AgNO₃ para formar una solución 0.05 M.
Flujo de fase móvil 0,65 ml/min.
Presión 2200 psi. Sensibilidad 0.10 AUFS

Purificación de las mezclas acetona-capsaicinoides

Para la purificación de la oleoresina se realizaron pruebas a nivel laboratorio utilizando un cilindro de separación tipo MIXXOR (Cole-Palmer), con el objeto de determinar condiciones de proceso que puedan ser escalables de manera robusta a nivel piloto. Se analizó un sistema agua-acetona-cloroformo. Debido a la miscibilidad entre la acetona y el cloroformo, se realizaron pruebas con diferentes proporciones de los componentes de la mezcla para evitar problemas de emulsificación. Una vez identificadas las porciones necesarias para tener mezclas que permitan realizar una separación de extracción líquido-líquido, se efectúan evaluaciones a nivel piloto en una columna oscilante tipo Karr, utilizando como alimentación agua mezclada con el extracto de acetona obtenido de las pruebas de extracción directa del fruto de chile y como solvente cloroformo. En las evaluaciones se mantienen las proporciones definidas en las pruebas realizadas a nivel vidrio en el MIXXOR y se aplican como referencia las condiciones de operación definidas por Tapia y col. 1993, para el aislamiento de capsaicinoides. Estos autores determinaron las condiciones de óptimas de operación para el aislamiento de capsaicinoides de un medio de cultivo de células de *capsicum* en una columna oscilante tipo Karr, analizando mediante un diseño de experimentos las siguientes variables de proceso: velocidad de oscilación, flujo de alimentación, flujo de solvente, amplitud de la oscilación, altura efectiva de la columna y concentración de capsaicinoides en la alimentación. Dentro de las principales conclusiones determinaron como variables de impacto a la velocidad de oscilación, altura efectiva de la columna y la relación de flujos alimentación-solvente.

Columna de extracción de platos oscilantes tipo Karr

La parte principal de la columna es tubo de vidrio borosilicato, altura total 5 m y diámetro interno de 2,54 cm. Dentro de la columna hay platos perforados de acero inoxidable, montados sobre un eje central el cual puede ser oscilado por medio de un mecanismo localizado en la parte superior de la columna. En la Figura 4 se presenta la columna de extracción y el principal equipo auxiliar. La amplitud de la oscilación puede variarse de 0 a 2 cm, mediante el ajuste en la longitud de un brazo manivela, la velocidad de oscilación puede ser variada de 0 a 400 ciclos/min. El amplio rango de ciclos y amplitud, proporcionan un grado de libertad adicional no presente en otros tipos de columnas de extracción, asegurando de esta forma los niveles de agitación requeridos para todas las aplicaciones. En la etapa a nivel piloto se realizaron pruebas hidráulicas para determinar el punto de inundación de la columna mediante el ajuste de la agitación y se efectuaron dos pruebas variando la relación agua-extracto de acetona, para evaluar en la oleoresina el nivel de purificación alcanzado respecto a la extracción de impurezas de la alimentación hacia la fase orgánica o solvente, las condiciones de operación restantes fueron mantenidas a los valores óptimos determinados por Tapia y col. 1993. Este tipo de procesos es otra de las aplicaciones importantes de la extracción líquido-líquido (Valcárcel, M., Silva, M. 1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables analizadas durante las pruebas realizadas directamente sobre el fruto de *capsicum*, fueron las siguientes: variedad de chile (Ch), cantidad de acetona en lt (CA), velocidad de agitación en rpm (V), tiempo de extracción en hr (Ag), temperatura en °C (Te), cantidad de chile en gr (Ca) y el número de extracciones practicadas (N). Se aplicó un diseño experimental del tipo ortogonal para identificar el efecto lineal de las variables (Taguchi, G. 1982). Los niveles de experimentación analizados se muestran en la Tabla 1.

TABLA I

Niveles experimentales para cada variable analizada.

Variables analizadas	Nivel 1	Nivel 2
(Ch) variedad del fruto de chile	Manzano	Serrano
(CA) cantidad de acetona en litros	1	1,5
(V) frecuencia del agitador en rpm	60	150
(Ag) tiempo de extracción en hr.	1	2
(Te) Temperatura en °C	26	40
(Ca) cantidad de chile en gr	100	200
(N) número de extracciones	1	2

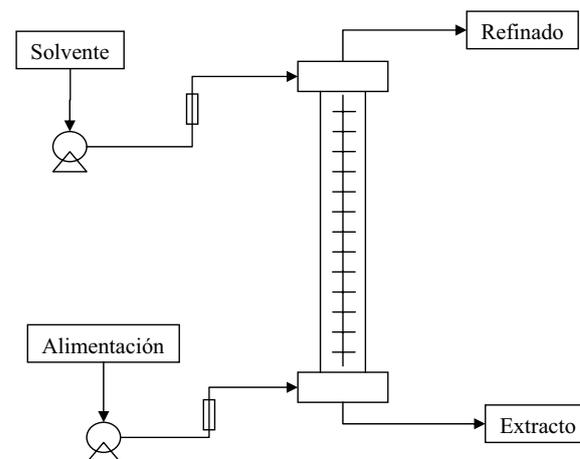


Figura 4. Columna de extracción de platos oscilantes tipo Karr.

Los resultados de las pruebas del diseño de experimentos se presentan en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis estadístico de las pruebas (ANOVA).

En orden de magnitud, las variables que afectan a la recuperación de capsaicinoides del fruto de chile son la cantidad de chile, cantidad de acetona, número de extracciones y temperatura de extracción. La Figura 5 muestra la dependencia de la concentración de capsaicinoides extraídos, respecto al número de extracciones y la cantidad de acetona, lo cual está representado por los lados A y B del polígono ABDF respectivamente. Las distancias perpendiculares de los extremos de los lados A y B, a la superficie que indica la concentración promedio de todas las pruebas, representa el impacto de la variable sobre este parámetro.

TABLA II

Resultados de las pruebas experimentales realizadas en el diseño ortogonal L₁₂.

Prueba/Factor	Te	N	Ch	Ag	V	Ca	CA	Error	Error	error	Error	Conc. (ppm)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	268
2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	59
3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	58
4	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	480
5	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	58
6	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	239
7	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	516
8	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	102
9	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	58
10	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	464
11	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2	84
12	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1	555

TABLA III

Resultados análisis estadístico.

Variable	Impacto en orden de magnitud respecto al error cuadrado promedio (prueba distribución F)
Cantidad de chile	Treinta veces
Cantidad de acetona	Diez veces
Número de extracciones	Siete veces
Temperatura	Cuatro veces

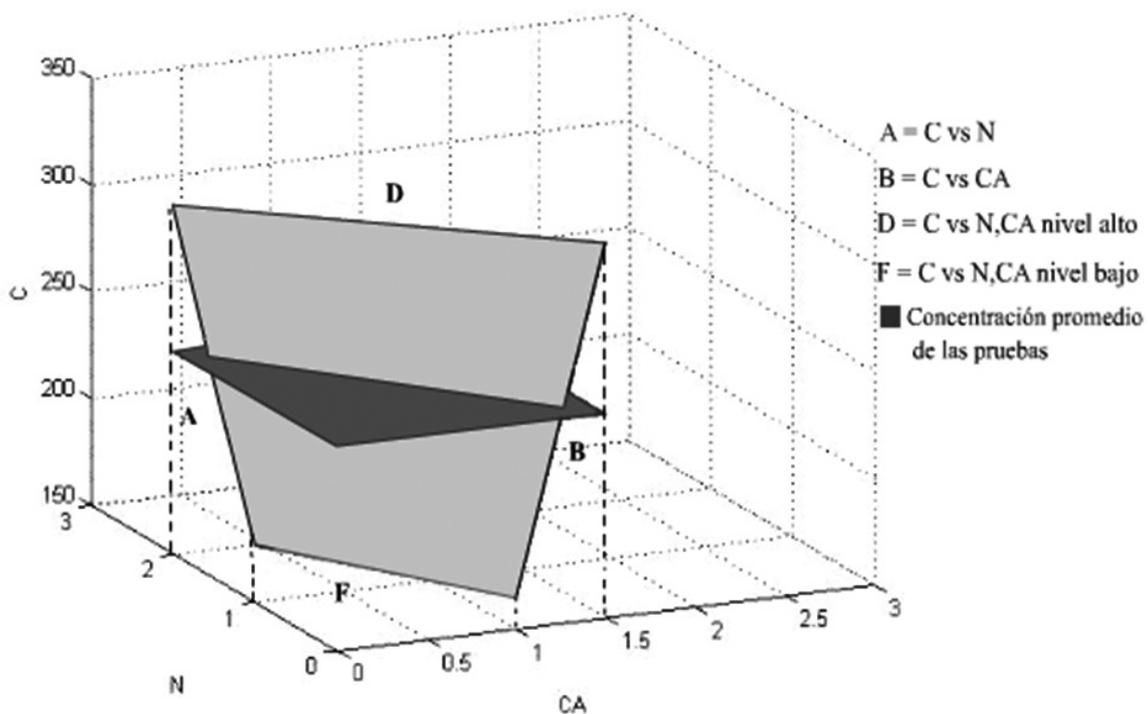


Figura 5. Dependencia de la concentración de capsaicinoides, respecto al Número de extracciones y Cantidad de Acetona.

TABLA IV

Parámetros de las pruebas realizadas en la columna oscilante tipo Karr.

Parámetro	Prueba 1	Prueba 2
Presión	Atmosférica	Atmosférica
Temperatura	25 °C	25 °C
Altura efectiva de la columna	366 cm	366 cm
Espaciamiento entre platos	5 cm	5 cm
Area libre por plato	0,55	0,55
Flujo volumétrico de la alimentación	26 lt/hr	26 lt/hr
Flujo volumétrico de solvente (cloroformo)	13 lt/hr	13 lt/hr
Concentración de extracto de acetona	9 % base peso	7 % base peso
Frecuencia de agitación	80 ciclos/min	30 ciclos/min
Porcentaje de inundación	Inundación de columna	80 %
Amplitud del desplazamiento	2,1 cm	2,1 cm

Fijando las variables críticas de la recuperación a sus niveles óptimos, se obtuvo un resultado promedio en la concentración de capsaicinoides de 560 ppm, equivalente a una concentración de 10 mg/gr de chile seco. Los resultados estimados por la técnica de análisis respecto a lo obtenido en las pruebas de reproducibilidad de las condiciones optimas, mostraron una desviación de 32,4 ppm, lo que representa un error del 5,5 %. El error es atribuible a la técnica analítica utilizada, así como a las características propias del sistema problema.

Para la purificación de la oleorresina se determinó condiciones de operación factibles en la columna de extracción, para mezclas entre 5-10 % de extracto de acetona en agua. El punto de inundación se alcanzó a niveles de agitación entre 20-80 ciclos/min para relaciones solvente/alimentación entre 0,45 y 0,55. En la Tabla 4 se presentan los parámetros de las pruebas realizadas a nivel piloto, para evaluar en la oleorresina el nivel de purificación alcanzado respecto a la extracción de impurezas de la alimentación hacia la fase orgánica. En la prueba uno se alcanza un nivel de inundación después de 5 minutos de operación continua. Al alcanzarse el punto de inundación se observa la formación de una emulsión en la fase continua. En la prueba dos se determinó una extracción de impurezas del 40 %. La evaluación de la concentración se realizó por HPLC. Al evaporar a vacío una muestra de extracto de la prueba 2, se encontró una ligera coloración y una capa de grasa, lo cual indica la presencia de colorantes y grasas en esta corriente. Los análisis de las muestras de extracto por HPLC no muestran la presencia de capsaicinoides, lo cual indica la no pérdida de capsaicinoides al realizar el proceso de purificación. Lo anterior es explicado por la reducción en la constante de distribución de los capsaicinoides en un sistema acuoso-cloroformo, al definir las proporciones de la mezcla agua-extracto de acetona-cloroformo. En esta prueba se determinó una fracción volumétrica acumulada de fase dispersa (*holdup*) de 0,32, este valor elevado implica que la prueba esta en inundación o muy cerca, lo cual es un valor recomendado para este parámetro en este tipo de equipos.

CONCLUSIONES

1. Para la extracción de capsaicinoides directamente del fruto de chile con acetona, se debe trabajar a una tem-

peratura de 40 °C, extraer con una cantidad de acetona de 1,5 lt, haciendo dos extracciones de una hora cada una, agitar a una velocidad entre 60 y 150 rpm en un recipiente de 20 cm de diámetro con un agitador tipo hélice de 12 cm, para una cantidad de 100 gr de chile previamente molido y seco. En la técnica anterior se puede utilizar chile manzano y serrano dando los mismos resultados, la única diferencia es el tiempo de molienda que involucra cada uno. El chile manzano se muele en un menor tiempo pero es más costoso.

2. Los resultados anteriores sirven como base para el escalamiento a nivel piloto, ya que incluyen datos de proceso y parámetros de mezclado.
3. Se ha determinado una mezcla agua-extracto de acetona-cloroformo y un proceso de extracción piloto, que permiten eliminar el 40 % de las impurezas presentes en la oleorresina obtenida mediante la extracción directa del fruto de *capsicum*. Para la obtención de una oleorresina con características comercializables, lo anterior constituye un proceso económico y de mayor productividad respecto a otros procesos, tales como sistemas de precipitación.
4. Para las pruebas de purificación a nivel piloto se debe ajustar la concentración de extracto de acetona en agua o reducir el nivel de agitación, para disminuir la posibilidad de arrastre de masa de la fase orgánica a la fase acuosa en la columna de extracción.
5. Se han definido las bases para diseñar una columna de purificación industrial (Karr 1985).
6. El proceso de purificación elimina la posibilidad de residuos de cloroformo en la oleorresina, el cual podría ser prohibido para aplicaciones de este tipo. Tomando como referencia los resultados de García (1990), se realizará posteriormente el estudio de un sistema utilizando acetato de etilo.

BIBLIOGRAFÍA

(1). Asian Herbex Ltd., <http://www.asianherbex.biz>, 2007.
 (2). Attuquayefio, V. K. «Rapid sample preparation method for HPLC analysis of capsaicinoids in *capsicum* fruits and oleoresins». *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 35, págs. 777-779, 1987.
 (3). Dorantes, L.; Colmenero, R.; Hernandez, H.; Mota, L. and Jaramillo, M.E. «Inhibition of growth of some foodborne path-

ogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts». *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 57, págs.125–128, 2000.

⁽⁴⁾. García, R. «Recuperación de capsaicinoides de un medio acuoso producidos por cultivo de células de *Capsicum*», Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Gto., México, 1990.

⁽⁵⁾. Hebei Tianxu, <http://www.hebtx.com>, 2007.

⁽⁶⁾. Heresch, F.; Jurenitsch, J. «Identification and quantitation method for mixtures of similar compounds. Natural capsaicinoids». *Cromatographia*, Vol. 12, No. 10, págs. 647-650, 1979.

⁽⁷⁾. Jones, N.L.; Shabib, S. and Sherman, P.M. «Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*». *FEMS Microbiology Letters*, 146: 223-227, 1997.

⁽⁸⁾. Karr, A.E. «Amplification of the Scale-up procedure for the Reciprocating Plate Extraction Column». *AIChE J.*, Vol. 31, (4), págs. 690-692, 1985.

⁽⁹⁾. Long, A.C. and Medeiros, D.M. «Evaluation of capsaicin's use in analgesic medicine». *Journal of Nutraceuticals*,

Functional and Medical Foods, Vol. 3, págs. 39–46, 2001.

⁽¹⁰⁾. Nelson, E.K. «Capsaicin, the pungent principle of *capsicum*, and the detection of *capsicum*». *Journal of Chemical Engineering*, Vol. 2, págs. 419-421, 1910.

⁽¹¹⁾. Rodríguez, M. «Manipulación del medio de cultivo de células de *capsicum annum* var *glabriusculum-aviculare* para la producción de capsaicinoides». Tesis profesional. UNAM., 1989.

⁽¹²⁾. Susuki, T.; Iwai, K. «Chapter 4, Constituents of red pap- per species: chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *capsicum* species». *The Alkaloids*, Vol. XXIII, Ed. Academic Press, Inc., 1984.

⁽¹³⁾. Taguchi, G. «Introduction to quality engineering». Assian Productivity Organization, 1982.

⁽¹⁴⁾. Tapia, J.C.; García R.; Rocha, A.; Escamilla, E.; Calva, G. «Capsaicin recovery from a cell culture broth». *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 32, No. 10, págs. 2242-2246, 1993.

⁽¹⁵⁾. Valcárcel, M. and Silva, M. «Teoría y Práctica de la extrac- ción Líquido-Líquido». Ed. Alhambra, S.A., 1984.