

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

4.1 Chile.

Clasificación Científica.

Reino: *Plantae*
Subreino: *Tracheobionta*
División: *Magnoliophita*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Asteridae*
Orden: *Solanales*
Familia: *Solanácea*
Género: *Capsicum*

El chile o pimiento, es un recurso agrícola en gran parte del mundo, en varios países incluso forma parte de la cultura, al ser utilizado como saborizante dentro de la dieta diaria y en medicina tradicional. El chile es el fruto de la planta del mismo nombre. Pertenece a la clase embriofita Siphonagema, su género *Capsicum*, con cinco especies: *pubescens* (rocoto), *annum* (serrano, jalapeño, piquín), *frutescens* (tabasco), *baccatum* (ají) y *chinense* (habanero). El chile contiene: agua, carbohidratos, proteínas, grasas, fibra, vitaminas A, B1 (tiamina), B2(riboflavina), B6, B12, vitamina C, azufre, calcio, cloro, cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, niacina, potasio, sodio y yodo. Los pimientos son demandados por su sabor acre y pungente, y por la asociación de este sabor y sus propiedades colorantes.

El pimiento *Capsicum* comprende 4 partes principales que son: el pericarpio, placenta, semillas y tallo. El pericarpio es la pared del fruto que conforma aproximadamente el 38% del *Capsicum*, en él se distinguen 3 capas: el exocarpio es la capa externa, delgada y poco endurecida, el mesocarpio es una capa intermedia y carnosa y el endocarpio que es la capa interior y de consistencia poco leñosa. En promedio, la placenta comprende el 2% del chile, 56% de semillas y un 4% de tallos. La propiedad que separa a la familia *Capsicum* de otros grupos vegetales, es un grupo de alcaloides denominados capsicinoides. En particular, una sustancia cristalina excepcionalmente potente y acre, que no existe en ninguna otra planta es la capsaicina, y es la principal fuente de acritud y pungencia en el pimiento *Capsicum*.

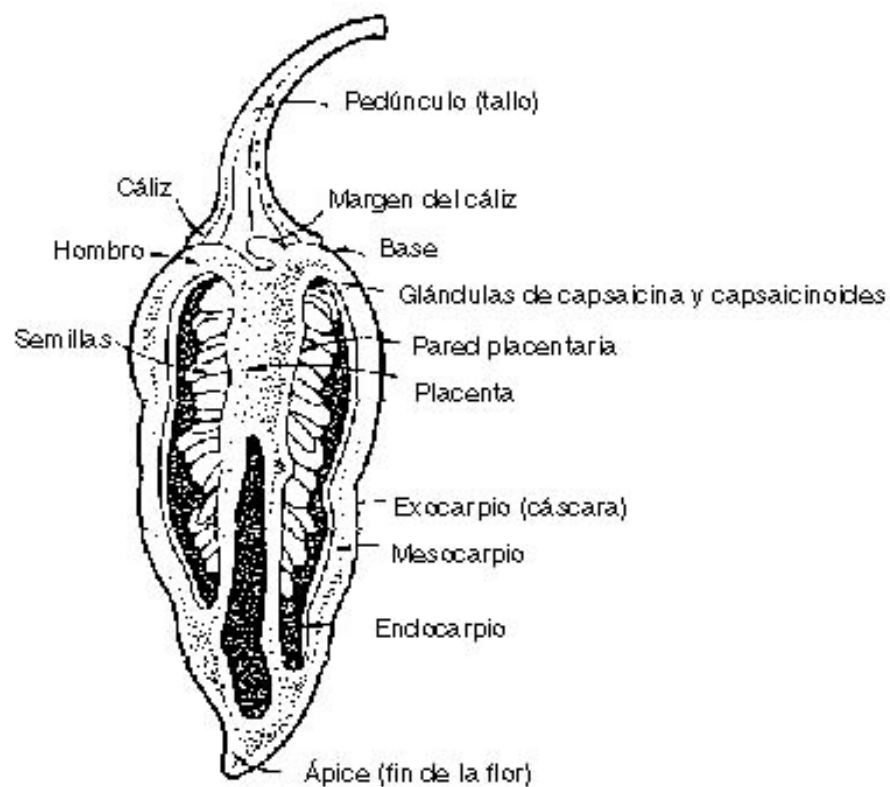


Figura 2. Anatomía del pimiento o chile.

La capsicina es producida por glándulas que se encuentran en el punto de unión de la placenta y la pared del pericarpio. La capsicina se extiende de modo no uniforme a través del interior del fruto y se concentra mayormente en el tejido placentario y en el pericarpio.

El porcentaje de capsicina en la planta de pimiento depende de la especie, del origen geográfico y de las condiciones climáticas. Los límites promedio en contenido de capsicina en un pimiento *Capsicum* son ⁴:

	Por 100 g de chile	Masa de capsicina (g)	mg capsicina / g chile	% de capsicina
Pericarpio	38	0.2204	2.204	51.80
Placenta	2	0.154	1.54	36.20
Semilla	56	0.051072	0.51072	12.00
Tallo	4	0	0	0

Tabla 1. Capsicina contenida en 100 gramos de *Capsicum*.

⁴ www.capstun.com

A partir de un kilogramo de pimienta de cayena, por ejemplo, se pueden extraer aproximadamente 2.13 g de capsicina cruda, que es alrededor de 20 veces la cantidad presente en la paprika o pimiento rojo.

Los pigmentos o carotenoides son compuestos que regulan directamente el color en los frutos *Capsicum*. Los carotenoides exclusivos del género *Capsicum* son capsantín, capsoburín y capsantín 5,6-epóxido.⁵ Los carotenoides son los responsables del color tan atractivo de los frutos, cuando son ingeridos, ejercen una acción biológica importante como antioxidantes y refuerzan el sistema inmunológico.⁶

La mayor parte de chiles que se comercializan internacionalmente está compuesta de productos de las variedades *C. annum* y *C. frutescens*.

4.1.1 Chile jalapeño.

El chile jalapeño es un fruto alargado de aproximadamente 7.5 cm y su diámetro de 2.5, el color lo define el grado de maduración que tenga, comenzando en verde, después amarillo, y hasta llegar a rojo que es la maduración total y entonces se le conoce como chilpotle. El peso de cada fruto fluctúa entre los 20 y 30 gramos y es de elevada pungencia, aspecto que los caracteriza.

⁵ Davies,B.; Matthews,S.; Kirk,J. 1970

⁶ Hornero,D.; Gómez,R.; Mínguez,M. 2000

		Jalapeño	Jalapeño	Chilpotle
Nutriente	Unidad	1 taza 90g	1 Chile 14g	1 taza 90g
Humedad	g	82.89		13.05
Cenizas	g	0.45		6.21
Proteína	g	1.215	0.189	14.40
Carbohidratos	g	5.319	0.827	42.03
Fibra	g	2.520	0.392	8.64
Ácido ascórbico	mg	67.68		21.78
Extracto etéreo	g	0.117		5.67
Aminoácidos				
Triptofano	g	0.015	0.002	
Lisina	g	0.055	0.009	
Fenilalanina	g	0.038	0.006	

Tabla 2. Composición nutritiva de chile jalapeño crudo (*Capsicum annum L.v.*) y chilpotle (*Capsicum annum L. dulce Hort.*).⁷

4.2 Capsicinoides

El ingrediente activo de los chiles, considerado en un inicio como una sola sustancia: capsicina, es una mezcla de homólogos di y tri insaturados, como lo demostraron los químicos japoneses S. Kosuge y Y. Inagaki en 1964. La mezcla

⁷ Boruges,H.; Morales,J.; Escobedo,G.; Camacho,I,M. 1996

es actualmente llamada capsicinoides. Los capsicinoides son producidos por glándulas en la placenta del chile, que es la parte superior justo debajo de tallo.⁸

Los componentes pungentes del *Capsicum annum* incluyen por lo menos cinco compuestos conocidos como capsicinoides a los que incluso se les ha valorado su pungencia.

Nombre	Nombre científico	Unidades Scoville	Porcentaje
Capsicina (C)	trans-8-metil-n-vanilil-6-nonamida	16,000,000	69 %
Dihidrocapsicina (DHC)	8-metil-n-vanilil-nonamida	16,000,000	22 %
Nordihidrocapsicina (NDHC)	7-metil-n-vanilil-octamida	9,100,000	7 %
Homodihidrocapsicina (HDHC)	9-metil-n-vanilil-decamida	8,600,000	1 %
Homocapsicina (HC)	trans-9-metil-n-vanilil-7-decenamida	8,600,000	1 %

Tabla 3. Clasificación de capsicinoides comúnmente presentes en *Capsicum annum*.

La capsicina y dihidrocapsicina son los compuestos más fuertes y producen ardor por toda la boca. Nordihidrocapsicina es el compuesto menos irritante y poco dulce; homodihidrocapsicina es un compuesto muy irritante y produce cierto ardor, el más prolongado en su duración. La homocapsicina produce poco ardor en la

⁸ Zewdie – Bosland 2000

garganta, con una sensación lenta de pungencia a través de ella.⁹ Evidentemente todos los capsicinoides actúan juntos para producir la pungencia de los chiles, pero la capsicina es el más fuerte de todos los compuestos. La fórmula molecular de los capsicinoides menos activos en pungencia es:

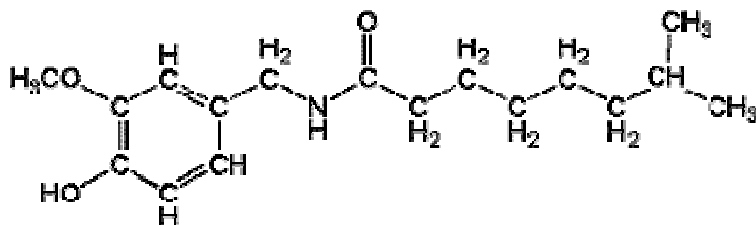


Figura 3. Molécula de nordihidrocapsicina.

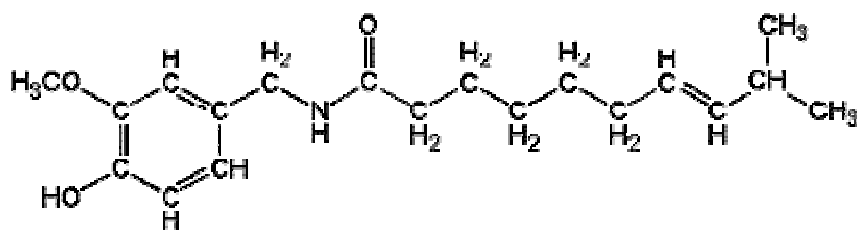


Figura 4. Molécula de homocapsicina.

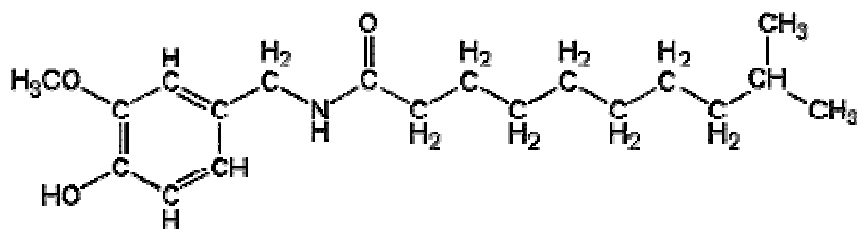


Figura 5. Molécula de homodihidrocapsicina.

En los frutos *Capsicum*, los capsicinoides son producidos y sintetizados en glándulas en la parte superior de la placenta. Los capsicinoides son acumulados en las vacuolas de las células epidémicas de la placenta, hasta ser

⁹ Krajewska,A.; Powers,J. 2001

metabolizados. Iwai y col.¹⁰ sugieren, que la producción de capsicinoides se incrementa conforme la maduración del fruto, hasta llegar a un máximo que depende de cada especie, posteriormente sufre cambios bruscos de degradación hasta un 60%, al igual que el fruto.

4.2.1 Capsicina

El principal ingrediente activo que causa la pungencia en los chiles es un compuesto sólido cristalino en forma de agujas llamado capsicina. La capsicina es un alcaloide increíblemente poderoso aparentemente inafectable por el frío o el calor, el cual retiene su potencial a pesar del tiempo, cocinado o congelado.

Dado que no tiene sabor, color u olor, solo incita la liberación de neurotransmisores que estimulan las células trigeminales, puntos receptores de dolor, en la lengua, estómago y boca. En respuesta a este estímulo, el cerebro libera endorfinas, las cuales proporcionan al cuerpo una sensación placentera, se acelera el metabolismo y ritmo cardiaco, se libera más saliva, se suda y se crea un estado temporal de euforia. A pesar de que no tiene sabor es uno de los compuestos más pungentes conocidos, detectable al paladar en diluciones de 1 a 70 millones. Es poco soluble en agua, pero muy soluble en alcohol, grasas y aceites.

Este compuesto se vincula a la medicina, a la industria alimenticia, a la de los colorantes y cosméticos y a la de los embutidos, entre otras. La capsicina como una óleo resina es demandada en la preparación de ciertas carnes frías como saborizante, como solución para salsas con pungencia definida, en la fabricación de cigarrillos, en la agricultura como repelente y en la ganadería menor contra mamíferos depredadores, como sustancia activa de las pinturas marinas para

¹⁰ Iwai, K.; Susuki, T.; Fujiwaki, H. 1979

rechazar la adherencia de caracolillos, como estimulante en la industria farmacéutica y como colorante en la industria de alimentos balanceados en sustitución de la flor de cempazúchitl.

La capsicina está disponible en forma natural o sintética. Se debe tener extremo cuidado con los compuestos sintéticos análogos que se emplean para aumentar la pungencia en extractos de *Capsicum* y también en imitaciones de óleo resinas *Capsicum* para reducir costos de producción. Algunos compuestos sintéticos análogos conocidos son:

N-vanilil octanamida, N-vanilil nonanamida, N-vanilil decanamida, N-vanilil undecanamida y N-vanilil paiperiacidamida.

Estos compuestos son ácidos en forma natural y causan serios daños a la salud¹¹.

4.2.1.1 Antecedentes.

P.A. Bucholtz en 1816 descubrió por primera vez que el principal agente de pungencia de los chiles se podía extraer con solventes orgánicos. En 1846, L. T. Thresh reportó en *Pharmacy Journal* que el principal pungente se extraía en estado cristalino. Fue Thresh quien nombró a la sustancia capsicina. En 1878, el médico y científico húngaro Endre Hogyes extrajo la capsicina a la que llamó capsicol y descubrió que estimulaba las membranas mucosas de la boca y estómago e incrementaba la secreción de jugos gástricos. La capsicina fue sintetizada por primera vez en 1930 por E. Spath y F.S. Darling.

¹¹ Contreras,P.; Yahia,E. 1998

4.2.1.2 Características físico - químicas.

La capsicina tiene la siguiente fórmula: $C_{18}H_{27}O_3N$, con un peso molecular de 305.199 g/g-mol. Forma cristales en forma de aguja, es inodora, con un punto de fusión de $64.5^{\circ}C$ y un punto de ebullición de $210 - 220^{\circ}C$. A una presión absoluta de 0.01 mmHg, se sublima a $115^{\circ}C$ y presenta su máxima absorción en UV a $227 - 228nm$. Es soluble en éter etílico, alcohol etílico, acetona, alcohol metílico, ácido acético, tetracloruro de carbono, benceno y álcalis calientes. Es insoluble en agua fría.¹²

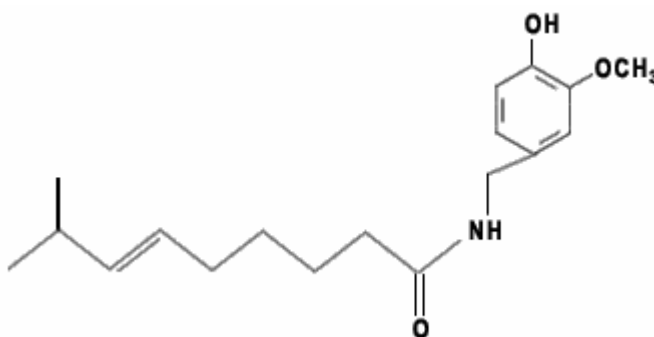


Figura 6. Molécula de capsicina.

La dihidrocapsicina tiene la siguiente fórmula condensa: $C_{18}H_{29}O_3N$ y un peso molecular de 307.215 g/g-mol, forma cristales de color blanco opaco e inoloro pero con una fuerte pungencia. Su punto de fusión varia entre 65.5 y $65.8^{\circ}C$, presenta su máxima absorbancia en UV por debajo de $230 nm$ y sus propiedades de solubilidad son idénticas a las de la capsicina.¹³

¹² García y Ortega. 1996

¹³ Iwai, K.; Susuki, T. 1977

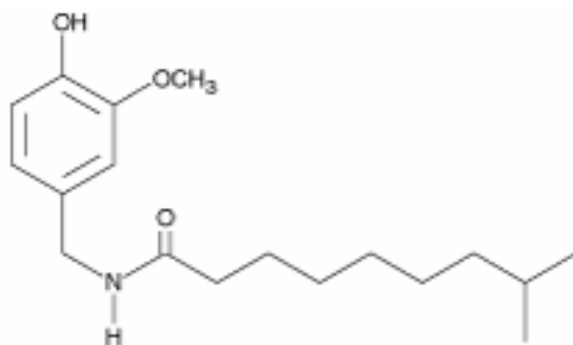


Figura 7. Molécula de dihidrocapsicina.

4.2.1.3 Mecanismo de acción.

Las sensaciones de ardor y dolor asociadas a la capsicina resultan de las interacciones químicas de esta sustancia con neuronas primarias sensoriales. La capsicina está relacionada a un receptor celular denominado vaniloide subtipo 1 (VR1), su nombre se debe al componente químico esencial que constituye a la capsicina y está catalogado como un receptor doloroso general, que responde igualmente al calor y abrasión física.

Estudios han demostrado que la capsicina estimula a los receptores VR1 incrementando la permeabilidad de la membrana celular para el flujo de cationes hacia el centro de la célula.¹⁴ La secuencia de permeabilidad de iones monovalentes y divalentes se presenta de la siguiente manera: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \sim \text{K}^+ \sim \text{Cs}^+$ (por cada 10 iones Ca^{2+} , pasa 1 de Na^+). Este fenómeno es conocido como despolarización neuronal, estimula el envío de señales al cerebro por medio del sistema nervioso central liberando neuropéptidos, incluyendo la sustancia P.

¹⁴ Caterina, M.; Shumacher, M.; Tominaga, M.; Rosen, T.; Levine, J.; Julius, D. 1997

La liberación de la sustancia P es la responsable de la sensación de ardor y dolor irritante.¹⁵ Tras un periodo de exposición, la capsicina genera un daño estructural en la fibra nerviosa, impide el paso de la sustancia P desde el soma de la célula hasta las porciones terminales de la fibra. Las investigaciones muestran que líneas celulares con VR1, mueren después de varias horas de exposición con capsicina, sin embargo, existe la posibilidad que de forma natural las células puedan regenerarse. La hipótesis de la muerte celular recae en el flujo excesivo y continuo de cationes al interior de la célula.¹⁶

4.2.1.4 Aplicaciones farmacéuticas.

Extensas investigaciones de capsicina, VR1, y la respuesta fisiológica a su activación química, aseguran que es un agente efectivo en padecimientos de dolor crónico, sobretodo, aquellos asociados con la espina dorsal, artritis y neuropatologías diabéticas.

Se ha encontrado que la capsicina estimula selectivamente y destruye la sustancia P en ciertos nervios que terminan en la piel y membranas mucosas. En este sentido, trabaja como un antisensibilizante. Este fenómeno ha sido observado en los sistemas cardiovascular y respiratorio donde hay una relación en el efecto que provoca la capsicina y la sustancia P. El descubrimiento de la efectividad de las aplicaciones de la capsicina al nervio dental para reducir la sustancia P como un transmisor del dolor de la pulpa dental, justifica el remedio antiguo de emplear chilpes picantes para el tratamiento de ese padecimiento.

Actualmente, existen en el mercado, cremas que contienen capsicina y que ayudan a reducir el dolor causado por herpes, es decir, la capsicina es utilizada

¹⁵ Presti. 1999

¹⁶ Clapham. 1997

como un analgésico auxiliar. La crema es aplicada durante varias veces al día en la zona afectada.¹⁷

Así mismo, las drogas o medicamentos que se pueden utilizar de forma individual o en combinación para el tratamiento de reumas, artritis y osteoartritis, se emplean con la finalidad de reducir los síntomas y por lo tanto elevar los ejercicios apropiados al tratamiento. Para estos objetivos, se aplican cremas directamente a la piel como una alternativa de medicina para aliviar el dolor.¹⁸ Por ejemplo, la crema Menthacin Arthritic Pain Relief, combina la capsicina y el mentol para combatir el dolor artrítico y al mismo tiempo, no presenta complicaciones por el uso simultáneo de medicinas anti-inflamatorias libres de esteroides (NSAIDS).

Los estudios del chile como agente terapéutico contra el cáncer no cesan, por tener altos contenidos de carotenoides, vitamina A y antioxidantes que reducen los riesgos de esta enfermedad.

La capsicina es también un agente reductor de los niveles de colesterol. Estudios muestran que la capsicina trabaja en dos puntos para reducir los niveles de colesterol: incrementando las enzimas responsables del metabolismo grasoso y disminuyendo la cantidad de colesterol absorbida en el cuerpo. La dihidrocapsicina, eleva los niveles de lipoproteínas de alta densidad de colesterol y disminuye las lipoproteínas de baja densidad, retardando la formación de depósitos de colesterol en las arterias (arteroesclerosis).

La capsicina ayuda a la circulación por sus efectos vasodilatadores: la presión sanguínea baja lo que reduce el riesgo de infartos cardíacos.

¹⁷ Manual MERCK, 2ª. Ed

¹⁸ Manual MERCK, 2ª. Ed

4.2.2 Medición de pungencia.

La manera más común de realizar la prueba de pungencia en los chiles, es probando la vaina.

Existe una prueba organoléptica: Scoville, basada en la percepción humana. Esta prueba ha sido utilizada desde 1912 para la determinación de pungencia. La realizó por primera vez Wilbur Scoville, originalmente consistía en la mezcla de chile puro con una solución azucarada, la cual bebían a sorbos los jueces, incrementando la concentración de dilución hasta alcanzar el punto en el cual el líquido no provocaba ardor en la boca; entonces se le asignaba un valor numérico basado en la cantidad en que se había diluido antes de que se perciba alguna pungencia.

La escala de Scoville se mide en múltiplos de 100 unidades, y muestra que los chiles más picantes son los habaneros anaranjados con 210,000 unidades Scoville y los habaneros rojos con 150,000 unidades.

Una ppm de concentración de capsicinoides es igual a 1.5 unidades Scoville.¹⁹
La capsicina pura se estima en 15,000,000 unidades Scoville

¹⁹ www.chilepepperinstitute.org

Nombre	Tipo	Especie	Unidades Scoville
Habanero anaranjado	Habanero	<i>C. chinense</i>	210,000
Jalapeño	Jalapeño	<i>C. annum</i>	25,000
Cayenne	Cayenne	<i>C. annum</i>	8,000
Pasilla	Pasilla	<i>C. annum</i>	5,500
Serrano	Serrano	<i>C. annum</i>	4,000
Mulato	Ancho	<i>C. annum</i>	1,000
Campana	Campana	<i>C. annum</i>	0

Tabla 4. Niveles de pungencia relativa en unidades Scoville .

4.3 Métodos de extracción de capsicina.

El término extracción, es usado para describir las operaciones de separación por métodos de transferencia de masa o mecánicos. Actualmente existen diversas tecnologías para la extracción de capsicina.

4.3.1 Lixiviado.

El lixiviado se refiere a la solución selectiva de uno o más constituyentes de una mezcla sólida al contacto con un solvente líquido. Este proceso es empleado para separar diversos productos orgánicos naturales de su estructura original, como raíces, hojas y semillas, al mantenerlos en contacto bajo ciertas condiciones de proceso con solventes orgánicos.

En algunos casos, las partículas pequeñas de un material soluble están completamente cubiertas por una capa de material insoluble. El solvente debe penetrar en el sólido, la solución resultante se difunde al exterior antes de que se presente una separación. La molienda de los sólidos puede acelerar la acción del lixiviado, dado que las porciones solubles estarán más accesibles para el solvente. Sin embargo, cuando la parte soluble está relativamente distribuida de forma uniforme en la estructura sólida, la acción de lixiviar puede lograr la formación de canales para el transporte de solvente fresco y entonces la molienda no es necesaria.

Los vegetales tienen estructuras celulares, frecuentemente las sustancias a ser lixiviadas se encuentran en el interior de células. Si la pared celular se mantiene intacta durante la exposición del solvente indicado, la acción del lixiviado involucra el transporte osmótico del soluto a través de la pared celular.

Para muchos productos farmacéuticos extraídos de raíces, tallos y hojas, el material de la planta frecuentemente es secado antes de darle tratamiento, y esto ayuda a la ruptura de la pared celular y libera el soluto para reaccionar directamente con el solvente. Las semillas vegetales son usualmente trituradas o aplanadas en un intervalo de tamaño de 0.15 a 0.5 mm. En este paso la célula se rompe y el extracto tiene mayor contacto con el solvente.²⁰

²⁰ Geankoplis, J. 2003

Usualmente se hace el lixiviado a la temperatura más alta posible, debido a que a temperaturas elevadas es mayor la solubilidad del soluto en el solvente, por lo tanto, las altas concentraciones en el licor de lixiviado son posibles, la viscosidad de los líquidos es menor y más altas las difusividades, permitiendo incrementar las velocidades de lixiviado. Con algunos productos naturales a temperaturas muy altas, puede permitir excesivas cantidades de solutos indeseables en el solvente o el deterioro químico del sólido.

La operación de lixiviado se puede realizar en condiciones batch, semibatch o continua. Existen dos técnicas aplicables: el esparado del líquido sobre el sólido o sumergir el sólido completamente en el líquido. La elección del equipo que se empleará depende de la forma física del sólido, costo y manejo.²¹

4.3.1.1 Velocidad de lixiviación.

En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso en general consiste en que el disolvente se transfiere del volumen de solución a la superficie del sólido. Después dicho disolvente penetra o se difunde en el sólido. El soluto se disuelve en el disolvente. El soluto se difunde a través de la mezcla de sólido y disolvente hasta la superficie de la partícula. Finalmente, el soluto se transfiere a la solución general.²²

Comúnmente, la velocidad de transferencia del disolvente de la solución general hasta la superficie del sólido es bastante rápida, y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta. Éstas no son las etapas que limitan la velocidad del proceso total de lixiviación. La transferencia de disolventes suelen ocurrir al principio, cuando las partículas se ponen en contacto con el disolvente; aun así, la

²¹ Geankoplis, J. 2003

²² Treybal, R. 2000

disolución del soluto en el disolvente en el interior del sólido puede ser un simple proceso físico de disolución o una reacción química que libera al soluto para la disolución.

La velocidad de difusión del soluto a través del sólido, y la del disolvente hasta la superficie del sólido suelen ser las resistencias que controlan el proceso global de lixiviación y dependen de diversos factores. Si el sólido está constituido por una estructura inerte porosa, con el soluto y el disolvente localizados en los poros del sólido, la difusión a través del sólido poroso se puede describir como una difusividad efectiva.

En sustancias biológicas y naturales, existe una complejidad adicional debido a la presencia de células. Para ello es indispensable determinar el tipo de estructura celular.²³

4.3.1.2 Método de operación y tipos de equipo.

Las condiciones de operación existentes son muy variadas, Se pueden llevar a cabo en lotes o condiciones estacionarias, continuas o no estacionarias. Ello dependerá del equipo necesario para la operación y las condiciones de concentración que se alcancen.

Cuando los sólidos son triturados suelen lixiviarse por percolación a través de lechos sólidos con fondos perforados para permitir el drenaje del disolvente. Así mismo, se puede operar con baterías de extracción que son tanques en serie, los cuales pueden ser abiertos o cerrados (difusores). La operación en estos tanques puede ser consecutiva o a contracorriente añadiendo disolvente fresco en la última etapa.

²³ Geankoplis, J. 2003

Se puede operar con equipos de lecho fijo, que comúnmente se usan en extracción de productos farmacéuticos de cortezas y semillas. El flujo para lixiviar se introduce en la parte superior a alta temperatura y se recupera en el fondo para conducirlo al siguiente tanque.

Otro mecanismo es la lixiviación con agitación del sólido, el cual puede triturado o mantenerlo en su estructura original; colocándolo en varios agitadores en serie con tanques de sedimentación o espesadores entre cada agitador o incorporándolos dentro del mismo tanque. La operación puede ser continua y contracorriente con el bombeo de sólidos en suspensión entre cada tanque.

El tiempo de contacto, la temperatura y la selección de equipo dependerán de las características del sólido, el equilibrio de fases y el factor económico.

Para el cálculo del proceso de lixiviación se puede hacer referencia al método referido por Badger y Banchemo.²⁴

4.3.2 Extracción supercrítica con dióxido de carbono (CO₂).

Un fluido supercrítico es una sustancia por arriba de su punto crítico, en el cual la fase líquida de la sustancia no existe. A esta temperatura y presión, el fluido supercrítico tiene propiedades entre el gas y la fase líquida. Estas propiedades hacen que los solventes de extracción como fluidos supercríticos tengan características de alta de transferencia de masa.²⁵

La extracción supercrítica con dióxido de carbono tiene muchas aplicaciones en los procesos naturales que involucran extracción de materiales sólidos en

²⁴ Badger,W.; Banchemo,J. 1970.

²⁵ Jarén,G.; Nienaber,U.; Schwartz,S. 1999

contenedores a altas presiones en operación batch o semi-batch. Para separar compuestos pungentes y pigmentos de carotenoides de la especie del *Capsicum*, se requiere de condiciones de temperatura media y presiones muy altas que oscilan entre 100 y 300 bars y el uso de fluidos supercríticos como el dióxido de carbono, ya que es un compuesto considerado como no tóxico y apto para el contacto con productos de consumo humano.

Se han realizado trabajos de investigación de este proceso, en diversas universidades, en su mayoría extranjeras, para evaluar el efecto de temperatura y presión sobre hojuelas de chiles.

El trabajo experimental básicamente, se realiza con equipos a escala de laboratorio; contenedores o columnas que van de 0.05 a 60mm de área de sección transversal. Lechos fijos con hojuelas secas de chile jalapeño, realizando pruebas con diferentes tamaños de partículas del sólido y presión. El dióxido de carbono, es el fluido supercrítico y recorre la columna a una velocidad proporcional a las condiciones del sistema.²⁶

4.4 Método de cuantificación de capscicina.

La cantidad específica de capscinoides presentes en los chiles, puede ser medida por métodos de laboratorio como High Performance Liquid Chromatography (HPLC). En este procedimiento, el chile debe ser secado y llevar a cabo un proceso de extracción de capscinoides; el extracto se inyecta a una columna de HPLC para su análisis. Este método es muy costoso pero bastante preciso. El equipo y procedimientos necesarios dependen de la marca del equipo que se tenga disponible.

²⁶ Duarte,C.; Crew,M.; Casimiro,T.; Aguiar,A.; Nunes,M. 2002

Otro método efectivo y poco costoso es la cromatografía en placa fina TLC. Consta de placas, generalmente vidrio, con una fase estacionaria en la que se aplica el extracto en forma de bandas de separación cromatográfica o puntos. La placa se pone en contacto con una fase móvil para el arrastre de los compuestos de extracción y la lectura de las bandas de separación se realiza con luz ultravioleta.

4.4.1 Cromatografía de placa fina.²⁷

La cromatografía de placa fina (TLC thin-layer chromatography) es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es plana, tomando la forma de la superficie en materiales de vidrio, aluminio o plástico.

La técnica de TLC es un método simple y de bajo costo que requiere poca instrumentación, la TLC es empleada para la separación de mezclas simples y su identificación cualitativa y cuantitativa por análisis visual de las muestras.

El proceso para llevar a cabo la cromatografía de placa fina es el siguiente:

²⁷ Sherma, J. 1999

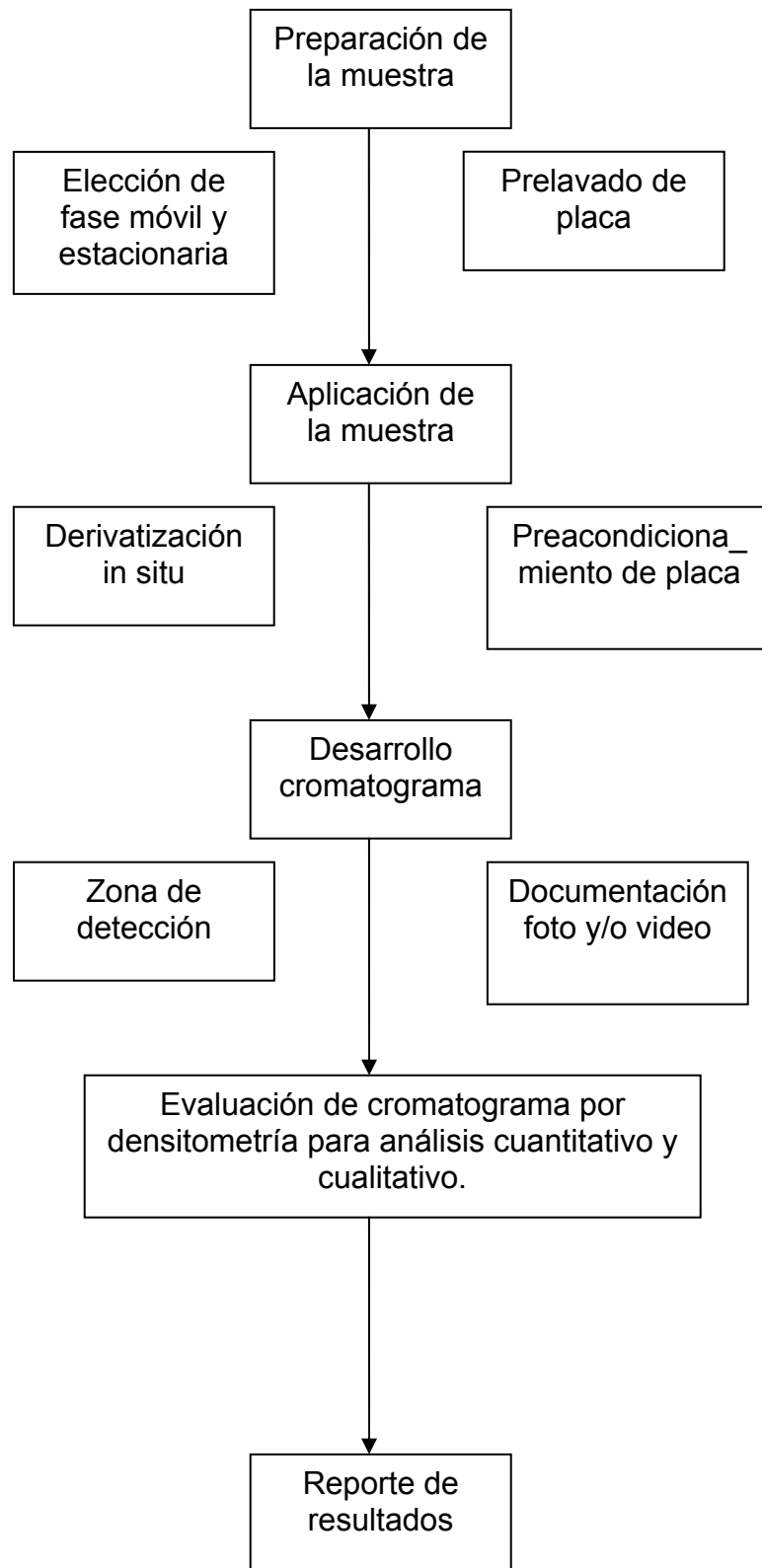


Figura 8. Diagrama esquemático de los pasos en el análisis de TLC.

Las ventajas de este arreglo y el empleo de placas, son la posibilidad de separar más de 70 muestras y estándares simultáneamente en un solo plato, y la habilidad de construir curvas de calibración de estándares bajo las mismas condiciones que las muestras; analizar las muestras con mínimas cantidades y sin temor de contaminación irreversible en la columna como puede suceder en la técnica de HPLC con inyecciones secuenciales y analizando muestras por pasos de múltiple separación y procedimientos de detección estática postcromatográfica.

Los platos de TLC, se emplean comúnmente con flujo capilar de la fase móvil sin presión, en modo ascendente u horizontal, sin embargo, pueden utilizarse métodos de flujo forzado para hacer pasar la fase móvil por la placa bombeándola bajo presión o con fuerza centrífuga.

En el flujo capilar de TLC, la velocidad de migración de la fase móvil disminuye con el cuadrado de la distancia con la que migra el solvente.

La TLC ha sido aplicada en todas las áreas de análisis incluyendo la Química, Bioquímica, Biología, Alimentos, Farmacéutica, estudios clínicos, productos naturales, Toxicología, forenses, ciencia de plantas, Bacteriología, Parasitología y Entomología. Los tipos de compuestos utilizados exitosamente para análisis en TLC incluyen los farmacéuticos y drogas, lípidos neutrales y polares, ácidos orgánicos, carbohidratos, amino ácidos, péptidos, fenoles, indoles, purinas, esteroides, vitaminas e inorgánicos.

4.4.1.1 Preparación de la muestra.

La solución debe estar lo suficientemente concentrada para que el analito pueda ser detectado en el volumen aplicado de muestra y bastante puro para ser separado en una zona discreta y compacta. El solvente en el que la muestra

está disuelta, debe ser de viscosidad y volatilidad tales que, humedezca la placa y no limite el potencial de desarrollo de la prueba durante la aplicación.

Las muestras relativamente puras en el extracto concentrado se pueden analizar directamente con TLC, sin embargo, si el analito está presente en bajas concentraciones en la muestra, se debe llevar a cabo una extracción, purificación y procedimientos de concentración de analito antes de realizar un análisis con TLC.

Las impurezas que puedan afectar la detección, deben ser eliminadas antes de aplicar esta técnica. Actualmente, existen placas con zonas preadsorbentes para limpiar la muestra reteniendo algunas sustancias que causan interferencia.

4.4.1.2 Fase estacionaria.

Las placas de TLC comerciales son soportes de vidrio, hojas de plástico o aluminio. Su dimensión es de 20 x 20 cm, 20 x 10 cm y 10 x 10 cm, cuentan con 0.25 mm de placa fina de 12 – 20 μm de tamaño de partícula desarrollada de 10 a 12cm.

La elección de la placa y la fase móvil se hace de acuerdo a la naturaleza de la muestra. La fase de adsorción normal o forzada en sílica gel con una fase móvil menos polar, como cloroformo – metanol es la comúnmente usada. La sílica gel puede ser impregnada con varios solventes, buffers y reactivos selectivos para mejorar la separación.

Las placas se pueden limpiar sumergiéndolas en metanol antes de la aplicación de la muestra, especialmente para cuantificar.

4.4.1.3 Fase móvil.

En TLC, la fase móvil es determinante para la separación el analito. En esta técnica, la fase móvil es evaporada antes de que las zonas sean detectadas, por lo tanto una variedad de solventes pueden utilizarse para preparar la fase móvil.

La fase móvil, generalmente consiste de dos a cinco solventes mezclados seleccionados empíricamente por personal capacitado o reportes de experimentos previos citados en la literatura.

Para una placa normal de sílica gel, los siguientes diez solventes son empleados (clasificación de Snyder):

- Grupo I: dietil éter
- Grupo II: isopropanol y etanol
- Grupo III: tetrahidrofurano
- Grupo IV: ácido acético
- Grupo V: diclorometano
- Grupo VI: acetato de etilo o dioxano
- Grupo VII: tolueno
- Grupo VIII: cloroformo

En TLC, la fase móvil puede cambiar su composición durante la prueba, debido a que diferentes constituyentes migran por la placa a diferentes velocidades.

4.4.1.4 Aplicación de muestras y estándares.

La aplicación de la muestra en forma de bandas cromatográficas, es favorable para separaciones de alta resolución y cuantificación precisa, utilizando la técnica

de alícuotas. Las bandas se forman incluso, cuando las muestras se aplican manualmente con una micropipeta en placas que contienen un preadsorbente o zona concentrada.

Estas placas, facilitan el análisis cuantitativo al aplicar diferentes volúmenes de la misma solución estándar que será aplicada para producir la curva de calibración densitométrica.

Los tiempos típicos para el desarrollo del cromatograma oscilan entre 3 y 60 min, el tiempo depende directamente del tipo de placa y la fase móvil.

4.4.1.5 Zona de detección.

Después de pasar la fase móvil, la placa debe ser secada en una campana para evaporar completamente los excesos de la fase móvil. Los compuestos separados son detectados en la placa por su color natural, fluorescencia natural, adsorbancia UV o zonas de fluorescencia después de reaccionar con un reactivo.

Las placas se calientan después de aplicar el reactivo detector para acelerar la reacción.

Los compuestos que naturalmente tienen color, se aprecian directamente en la placa durante el día, mientras que los compuestos con fluorescencia natural se ven como zonas brillantes en un entorno oscuro bajo luz UV. Los líquidos cromogénicos y fluorogénicos selectivos, se aplican por esparado o con gotero sobre la placa.