

5. METODOLOGÍA.

Actualmente, las semillas de chile jalapeño son un desecho del proceso de elaboración de rajas y chilpotles enlatados de la Empacadora San Marcos, ubicada en el Municipio de Rafael Lara Grajales, Puebla. El proyecto de utilización de estas semillas, como materia prima en el proceso de obtención de capsicina, representa un beneficio ambiental que favorece una actividad económica, y se justifica por el hecho de que las semillas contienen usualmente 19% de aceite que contiene el 12% (p/p) del total de capsicina contenida en el chile.

5.1 Variables experimentales.

El método de obtención de capsicina se realizó en base al método oficial estadounidense AOAC INTERNATIONAL 995.03 ([anexo A](#)) para la obtención de capsicinoides en *Capsicum* y sus extractos, el cual se aplica para la determinación de 750 – 650,000 unidades Scoville de capsicinoides. Se introduce una variación al método para incluir la cuantificación de capsicina por el método de cromatografía en placa fina TLC.

La relación de las sustancias para extracción experimental empleadas en este análisis y establecidas por el método AOAC son: 25 g de semilla / 200 mL de solvente.

La semilla empleada para el método, fue obtenida del residuo del proceso de enlatado de chiles chilpotles de Empacadora San Marcos. La semilla se utilizó con sus características físicas de humedad, estructura y color que ya presentaba, sin un pretratamiento de secado ni de molienda.

Los solventes de extracción, seleccionados en base a sus características fisicoquímicas y por su capacidad para disolver capsicina; son los siguientes: [acetoniitrilo](#), [ácido acético](#), [benceno](#), [cloroformo](#) y [etanol](#).

Se excluyeron de las pruebas experimentales el cloroformo y el benceno, debido a que estos compuestos tienen un alto grado de toxicidad. Por lo tanto, el análisis de extracción se realizó con los solventes restantes: acetoniitrilo, ácido acético y etanol. Se propone la extracción con los solventes puros y la combinación de éstos, para analizar si su composición es determinante en la obtención de capsicina. Los porcentajes de las mezclas binarias analizadas a los tiempos de extracción propuestos son los siguientes:

Etanol % - Acetonitrilo %	Etanol % - Acético %	Acetonitrilo % - Acético %
0 – 100	0 - 100	0 - 100
25 – 75	25 - 75	25 - 75
50 – 50	50 – 50	50 – 50
75 – 25	75 – 25	75 – 25
100 -0	100 -0	100 -0

Tabla 5. Porcentajes de solventes de extracción.

Para determinar el tiempo óptimo de residencia se realizaron pruebas a 3, 4, 5 y 6 horas de extracción a presión atmosférica.

Se experimentó a dos diferentes temperaturas: la primera, la temperatura que mantuviera una ebullición de núcleos de la solución de extracción, la segunda, una temperatura ligeramente menor a la temperatura de saturación de la solución. La finalidad de esta variación es analizar si la ebullición de núcleos determina un incremento en la transferencia de masa de soluto a la solución.

La elección del sistema de análisis, dependerá de los resultados de las pruebas preliminares de los solventes de extracción.

5.2 Materiales y métodos.

Los materiales empleados en el análisis experimental son: ácido acético glacial; alcohol etílico al 96%; acetonitrilo; semilla de chile chilpotle y capsicina 100%.

5.2.1 Extracción.

Para la caracterización del proceso de extracción se realiza el siguiente método:

1. Pesar 5 g de semilla de chile chilpotle en una balanza analítica Adventurer Ohaus.
2. Medir 40 mL de solvente de extracción en una probeta graduada.

3. Mezclar las semillas con el solvente de extracción en un matraz redondo de 250 mL, colocarlo en un electrothermal de 150 W para mantener la temperatura constante.
4. Conectar el matraz redondo a un intercambiador de calor, para condensar los vapores del solvente y recircularlos. El fluido para la condensación fue agua a 5 °C.
5. Al finalizar el tiempo determinado de extracción, se retira el matraz de la fuente de calentamiento y se deja enfriar a temperatura ambiente.
6. Separar las semillas de la solución y colocarla en tubos de 10 mL cada uno.

Este método se realizó con todas las mezclas de solventes de extracción y tiempos de extracción ya mencionados.

5.2.2 Evaporación.

Para la concentración de la capsicina contenida en la solución de extracción se realiza el siguiente método:

1. De la solución extraída, medir 5 mL de solución y colocarla en un matraz redondo de 10 mL.
2. Conectar el matraz a un intercambiador, para condensar los vapores del solvente de extracción y recuperarlos.
3. Colocar el matraz en un baño de agua, y éste a su vez, en una parrilla para la evaporación del solvente.

4. El tiempo de evaporación se limitaba hasta recuperar 4.3 mL del solvente, es decir, el 86% de 5 mL de solución.
5. Colocar la solución evaporada en tubos ependor con capacidad de 5 mL.

5.2.3 Cuantificación de capsicina.

Para la cuantificación de la capsicina contenida en la solución concentrada se realizó el método de TLC con placas de dimensiones 20 x 10 cm, con fase estacionaria de sílica gel 60 F 254 in, mediante los siguientes pasos:

1. Considerar los siguientes parámetros para aplicar las muestras en forma de bandas de separación cromatográfica:

Parámetro	mm
Distancia del límite inferior de la placa.	8
Distancia entre el límite derecho e izquierdo de la placa.	10
Espacio mínimo entre cada banda de separación de muestra.	4
Longitud de banda de separación cromatográfica de muestra.	8
Longitud máxima para el desarrollo de banda de muestra.	50-80

Tabla 6. Parámetros para la aplicación de muestra en placa TLC.

2. Preparar soluciones con capsicina pura a 1000, 1300, 1500, 1700 y 1900 ppm.
3. Aplicar 0.0012 g de muestra problema, solución concentrada de capsicina del proceso de extracción, con las características antes mencionadas.
4. Aplicar 0.0012 g de cada solución de concentración conocida de capsicina.
5. Secar la placa con aire frío durante 5 minutos.
6. Preparar la cámara TTC, Twin Troug Chamber marca Camag, limpiándola y secándola entre cada corrida.
7. Medir 20 mL de la solución de la fase móvil y colocarla en el interior de la cámara, colocar la tapa por 20 minutos para permitir la saturación de solvente fase móvil en el interior de la cámara.
8. Introducir la placa TLC hasta alcanzar la longitud de desarrollo de banda de muestra, 60 mm.
9. Retirar la placa de la cámara y secar con aire frío durante 5 minutos.
10. Determinar la concentración de capsicina por densitometría, con lectura de las bandas de separación cromatográfica con luz UV de 265 nm, con un equipo BIO RAD y digitalizar la imagen con el software Quantity One versión 4.2.0.