

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Extracción de capsicinoides

Para aislar los alcaloides que se encuentran en la fracción aceitosa de varias especies de plantas o en este caso semillas de chile jalapeño, se debe preparar la materia prima, someterla a extracción, purificar el extracto y determinar cualitativa o cuantitativamente los alcaloides obtenidos. Las diferencias en los métodos de aislamiento residen en: a) el tipo de solvente que se utiliza para la extracción (cloroformo, metanol, acetona, éter etílico, acetato de etilo, cloruro de metilo, etanol, metanol, 2-propanol, acetonitrilo entre otros); b) el pretratamiento de la muestra y c) el método de determinación de alcaloides que incluye espectrofotometría, cromatografía de placa fina (TLC), cromatografía de gases y cromatografía de líquidos (HPLC).

4.1.1 Técnicas de extracción de capsicinoides

Los métodos de aislamiento se han estudiado desde 1930. El primer proceso de extracción se basaba esencialmente en concentrar la oleorresina del chile por extracción con solventes durante un tiempo determinado aplicando temperatura para luego evaporar el solvente residual [40]. En esta investigación se tomaron de referencia algunas de las técnicas de separación hasta hoy conocidas para obtener el procedimiento con el cual extraer y determinar los capsicinoides contenidos en la semilla de chile jalapeño.

Del conjunto de técnicas existentes se seleccionaron los solventes a utilizar en la extracción, tiempos de extracción, tratamiento del extracto antes del análisis y las condiciones del método de determinación, que en este caso es HPLC, como lo son el tipo de columna, la velocidad de flujo, la fase móvil y la longitud de onda que debe usar el detector. Los procedimientos son muy variados y se analizaron métodos que extraen alcaloides contenidos en plantas y técnicas más específicas en las que se extraen

capsicinoides mediante solventes y fluidos supercríticos como lo reporta Gnayfeed y col. (2001).

Con respecto al solvente de extracción la mayoría de los métodos proponen manejar etanol como solvente de extracción ya que es con el que se obtiene la mayor concentración de capsicinoides en el extracto como lo muestra Santamaría y col. (2000) obteniendo 290 mg de capsicinoides por 100 g de harina de chile. Por otro lado Epstein y col. (1993) utilizaron diclorometano para la extracción de un alcaloide llamado piperina obteniendo 3510 mg por 100 g de pimienta; es importante mencionar que el solvente es un compuesto tóxico y que se extrae una gran cantidad de alcaloides puesto que la pimienta contiene un porcentaje más alto de estos que el chile; Peusch y col. (1997) utilizaron metanol, acetona, acetato de etilo, dietil eter y diclorometano extrayendo un máximo de 89 mg por 100 g de chile y Kirschbaum-Titze y col. (2002) utilizaron metanol obteniendo 63.2 mg por 100 g de chile

Como lo demuestran Shimadzu [38] y Peusch y col. (1997) se debe tener especial cuidado en el pre tratamiento de la muestra del extracto de oleorresina ya que se pueden presentar interferencias en los cromatogramas de HPLC si no se purifica el extracto correctamente ya que el detector determinará además de capsicinoides otros compuestos que no son de interés en la investigación. También se presentan interferencias dependiendo del solvente que se haya utilizado, según Peusch y col. (1997) las interferencias aumentan conforme aumenta la polaridad del solvente. La gráfica que a continuación se muestra corresponde a un cromatograma obtenido por HPLC donde se aprecian interferencias puesto que los picos de la capsicina y la dihidrocapsicina no se definen correctamente lo cual es importante para determinar cuantitativamente los capsicinoides.

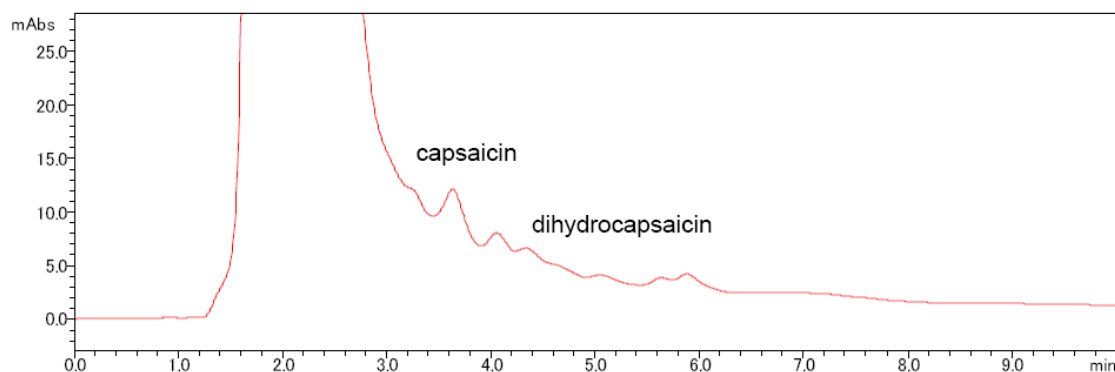


Ilustración 4-1 Cromatograma de extracción con etanol [38].

Los autores que utilizan HPLC como método de determinación son: Santamaría y col. (2000); Kirschbaum-Titze y col (2002); ASTA Analytical Methods. (2001); Restek [37]; NIOSH (NMAM) [36]; Peusch y col. (1997) y AOAC (1999) y realizan la determinación con un flujo de 1 – 1.5 ml/min y una columna tipo C₁₈. Todos ellos utilizan una fase móvil de acetonitrilo:agua:ácido acético, excepto por el método NIOSH (NMAM) [36] donde usan acetonitrilo:agua. Al tener una fase móvil base se realizaron experimentos cambiando las proporciones de la mezcla de acetonitrilo:agua con y sin ácido acético para encontrar el porcentaje adecuado como se verá en el capítulo de materiales y métodos. Los otros autores proponen diferentes tipos de determinación: Shimadzu [38] usa cromatografía de líquidos seguida de espectrofotometría de masas; Wei y col. (2002) utiliza electroforesis capilar y por último Epstein y col. (1993) y Celis. (2004) utilizan el método de cromatografía en capa fina (TLC).

4.2 Bases de la high performance liquid chromatography (HPLC) [9].

La cromatografía se utiliza para separar los compuestos de una mezcla y así reconocer la presencia o ausencia de un número limitado de especies químicas cuyas identidades son conocidas. Los componentes de una mezcla son llevados a través de una fase estacionaria (sólida) por medio del flujo de una fase móvil que es líquida. Las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración en la fase estacionaria de los componentes de la muestra.

En una columna cromatográfica de elusión se pueden separar diferentes componentes de una muestra. La elusión es el lavado de un soluto a través de una columna agregando un disolvente o fase móvil. Una porción de la muestra disuelta en la fase móvil es introducida en la columna en donde los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases.

Todas las separaciones cromatográficas se basan en diferencias en el grado al cual los solutos se reparten entre la fase móvil y la estacionaria; la fase móvil mueve a la porción disuelta de la muestra y en la fase estacionaria ocurre una partición entre la fase móvil y porciones de la fase estacionaria. Los primeros picos son las especies que no son retenidas por la fase estacionaria. En una columna de sílica, el compuesto menos polar eluye primero y a medida que fluye más disolvente los otros componentes continúan moviéndose [3]. El grado de ensanchamiento de la banda depende del tiempo que la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria. Por consiguiente la eficiencia de la columna depende de la velocidad de flujo de la fase móvil.

Si se coloca en el extremo de la columna un detector y su señal se grafica como una función del tiempo, se obtiene una serie de picos conocidos como cromatograma. La cromatografía cuantitativa se basa en la comparación ya sea de la altura o del área del pico de un analito en un cromatograma, con el de uno o más estándares. Si se controlan apropiadamente las condiciones, ambos parámetros varían linealmente con la concentración. Por lo que las posiciones de los picos sobre el eje del tiempo se pueden emplear para identificar los componentes de la muestra.

Las variables que se deben controlar son: la temperatura de la columna, la velocidad del flujo de la fase móvil y la velocidad de inyección de la muestra. De las variables, el efecto de la velocidad de inyección de la muestra es particularmente crítico para los primeros picos de un cromatograma.

Para tener una mejor precisión en la medición cuantitativa de los analitos de la muestra se deben utilizar estándares internos ya que las incertidumbres introducidas por la inyección de la muestra, la velocidad de flujo y las variaciones en las condiciones de la columna se logran minimizar. En este procedimiento se agrega una cantidad

conocida de estándar, conocido como estándar interno, dentro de cada muestra a analizar y el parámetro analítico es la relación del área del pico del analito en la muestra al área del pico del estándar interno. Lo que quiere decir que el área del pico del analito tendrá un aumento debido a la adición del estándar y el área que aumentó es la cantidad de estándar interno dentro de la muestra.

4.3 Propiedades de seguridad del ácido acético y etanol.

Para extraer capsicinoides se pueden utilizar ácido acético o etanol obteniendo por medio de los dos químicos casi la misma concentración de capsicinoides en el extracto. Estos dos solventes de extracción se utilizan debido a que en bajas concentraciones, no son perjudiciales para la salud del hombre y porque los enlatados o alimentos en conserva poseen un porcentaje de estos químicos. Ya que los dos reactivos poseen las mismas ventajas para elegir el solvente adecuado se consultaron las Normas Oficiales Mexicanas NOM-018-STPS-2000 y NOM-052-SEMARNAT-1993 a efecto de determinar las características peligrosas de cada uno de ellos y a partir de ello tomar una decisión con base en las medidas de seguridad necesarias al utilizar estos químicos a nivel industrial.

La Secretaria del Trabajo y Previsión Social (STPS) establece un número de riesgo dependiendo de las características de la sustancia química, ya sea por su inflamabilidad, riesgos a la salud, reactividad o riesgos especiales. A continuación se presenta una tabla con las características de riesgo tanto del etanol como del ácido acético según los números que la STPS les asignó conforme a la NOM-018-STPS-2000:

Tabla 4-1 Características de riesgo de ácido acético y etanol NOM-018-STPS-2000.

No.	Sustancia	CAS	NFPA				HMIS			
			Nat. Fire Protection Assoc.				Hazardous Mat. Identification System			
			S	I	R	RE	S	I	R	EPP
106	Alcohol Etilico	64175	0	3	0	NA	4	3	0	H
43	Ácido Acético	64197	3	2	0	NA	4	2	0	H

S salud; I inflamabilidad; R reactividad; RE riesgos especiales.

EPP equipo de protección personal.

H: se deben usar goggles para salpicaduras, guantes, mandil y respirador de vapores.

Donde cuatro es el riesgo más alto y cero es el valor más bajo.

Para identificar los grados de riesgo de las sustancias, la Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS) propone que en el envasado de los químicos se coloque un etiquetado donde se puedan leer los riesgos. La etiqueta debe tener un rombo, el cual debe presentarse de la siguiente manera identificando los riesgos del componente químico mediante números establecidos para cada uno de ellos en la NOM-018-STPS-2000.

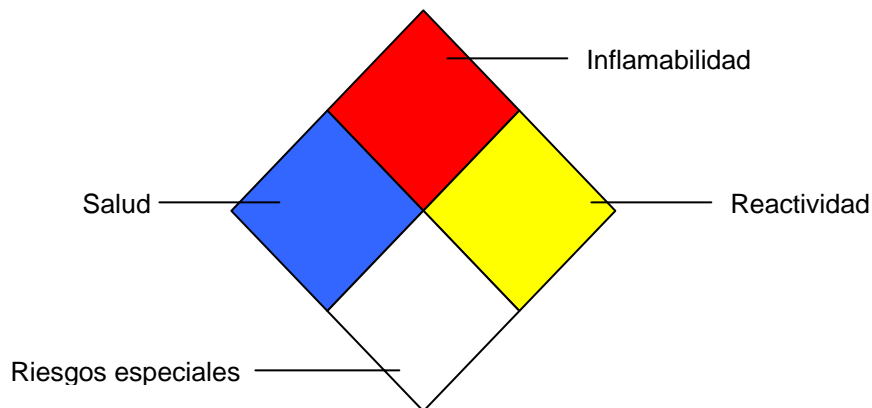


Ilustración 4-2 Rombo de grado de riesgos. NOM-018-STPS-2000

Según la NOM-052-SEMARNAT-1993 el ácido acético es considerado tóxico e inflamable mientras que el etanol es considerado inflamable; por lo que los dos pertenecen a la lista de químicos peligrosos y con ambos se deben tener precauciones y consideraciones especiales en su manejo; para ver un plan de control de riesgos y que hacer en caso de emergencia, consultar anexo A.