

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS.

Como se indicó con anterioridad, existen diversos métodos para la extracción y determinación de capsicinoides. El método fue desarrollado tomando como base la propuesta de Celis. (2004), el Método Oficial de la AOAC. (1999) Anexo C y Santamaría y col. (2000). Sin embargo se hicieron adecuaciones en el método de determinación por HPLC conforme se realizaban los experimentos. A través de diferentes pruebas de ensayo y error el procedimiento final propuesto para la determinación de capsicinoides es el siguiente:

### 5.1 Secado.

En la mayoría de los casos, el manejo que reciben las semillas después de ser procesadas y almacenadas no es el apropiado debido a que no se utilizan las técnicas de conservación que permitan reducir al mínimo su deterioro. La alta humedad y el almacenamiento favorecen el daño por hongos, insectos y patógenos por lo que no se puede hacer un uso posterior de la semilla. Por otro lado se debe frenar el proceso de germinación, a través de la eliminación del agua que contienen las semillas para lo cual se reduce la humedad usando aire a altas temperaturas. Para no destruir los componentes de las semillas, dicho aire se aplicará una vez que la mayor parte de la semilla se haya secado [11].

En el laboratorio se seca la semilla utilizando un horno o estufa al vacío para simular una opción de secado que se puede utilizar en el proceso industrial.

Materiales:

- 10 g de semilla de jalapeño.
- Estufa al vacío (Squaroid Lab-Line).
- Balanza analítica con capacidad de 200.0000 g (Shimadzu Libor AEU-210).
- Balanza analítica con capacidad de 200.00 g (Scout OHAUS).
- Cronómetro.

- Tres crisoles.
- Pinzas para crisol.
- Ácido Nítrico al 30%.

Procedimiento para secado en horno:

- Se ponen tres crisoles a peso constante. Primeramente lavar los crisoles con  $\text{HNO}_3$  y dejarlos una hora en la estufa a vacío a  $100^\circ\text{C}$  y para después pesar hasta que el peso no varíe.
- Se pesan 0.5 g de semilla en la balanza con capacidad de 200.00 g y se añade a los crisoles.
- Se pesan los crisoles con semilla en la balanza con capacidad de 200.0000 g.
- Se meten los crisoles a la estufa durante un minuto.
- Se pesan e introducen a la estufa de nuevo durante otro minuto. Los crisoles se pesan cada minuto hasta llegar a los 10 minutos, luego se pesan cada dos minutos hasta los 20 minutos, para luego pesar cada cinco minutos hasta llegar a un peso constante.

Este método se hizo utilizando tres temperaturas:  $80^\circ\text{C}$ ,  $100^\circ\text{C}$  y  $120^\circ\text{C}$  para determinar el tiempo de secado de cada una de ellas.

Al finalizar el secado se debe guardar la semilla ya sea en un frasco de vidrio o de plástico y colocarlo en el refrigerador para mantener las propiedades físicas y químicas de la semilla.

## **5.2 Molienda.**

La molienda favorece la extracción, ya que se consigue la rotura de la pared celular de la semilla, lo cual favorece la exposición de la oleorresina de capscina localizada en el interior de la célula y por ende se facilita la percolación del disolvente, en el que se puede difundir dicha oleorresina.

El método más común de molienda de semillas en la industria es la trituración por medio de molinos de rodillos y de martillos. Para simular una molienda por estos métodos se realizó el siguiente procedimiento:

Materiales:

- Semilla de chile jalapeño seca.
- Mortero con pistilo de porcelana.

Procedimiento:

- Se tritura la semilla en el mortero con pistilo de tal forma que se simule un molino hasta que se obtenga una harina de semilla de chile.

Al igual que el secado al moler la semilla, ésta se deberá almacenar en el refrigerador en frascos.

### **5.3 Extracción.**

El punto de partida para estudiar la extracción de capsicinoides fue el Método Oficial de la AOAC. (1999). Se utilizó etanol como solvente ya que es el más usado para la extracción y como lo reporta Amaya Guerra y col. (1997) la extracción de oleoresina de chile guajillo seco es favorecida por la extracción con etanol.

Materiales:

- Semilla de chile jalapeño seca y molida.
- Condensador a reflujo.
- Bomba sumergible.
- Mangueras.
- Nicho de calentamiento (electrothermal de 150W).
- Termómetro.

- Matraz de bola de 500 ml.
- “Y” de vidrio con dos entradas hembras.
- “Y” de vidrio con una entrada macho.
- Dos Matraces de bola de 100 ml.
- 6 matraces Erlen Meyer.
- Filtros del número 4.
- Embudo de vidrio.
- Etanol al 100%.

Procedimiento:

- Se pesa la harina y se coloca en un matraz de bola de 500ml.
- Se añade etanol, se conecta el matraz a la “Y” con las dos entradas hembras y ésta se conecta al condensador de reflujo.
- Se deja a reflujo durante 5 horas a una temperatura de 78.5°C y se deja enfriar.
- Se filtra la semilla con el extracto y se coloca la fase líquida o extracto en un matraz de bola de 100 ml.
- Se conecta el matraz a la “Y” con una entrada macho y en la entrada macho se conecta el otro matraz de 100 ml.
- Se deja calentar para recuperar el etanol y obtener 8 ml aproximadamente del extracto concentrado.
- Se coloca el extracto en un matraz Erlen Meyer para diluirlo.

Se repitió el procedimiento variando la masa de harina de semilla de chile y el volumen de etanol de la siguiente forma: 10 g – 100 ml, 15 g – 100 ml, 20 g – 100 ml, 25 g – 200 ml, 25 g – 80 ml y 25 g – 150 ml.

Se debe recordar que si no se realiza la determinación cromatográfica inmediatamente el extracto se deberá mantener a bajas temperaturas para evitar su descomposición.

#### 5.4 Determinación analítica de capsicinoides.

La cromatografía de líquidos sirve para determinar diferentes analitos en una muestra, para esto se requiere saber qué tipo de columna se debe utilizar (longitud, diámetro, tipo de partícula de la fase estacionaria y tamaño de partícula) así como la longitud de onda del detector y la fase móvil. Para la elección de la columna C<sub>18</sub> y la longitud de onda de 280 nm se consultó el método AOAC. (1999).

La primera corrida que se hizo en el HPLC fue usando una fase móvil de 60% agua, 40% acetonitrilo y 1% de ácido acético en el agua, con un flujo de 1.5 ml/min. El cromatograma no mostraba perfectamente los tres picos esperados por lo que el flujo se cambió a 1 ml/min y luego a 0.8 ml/min para lograr separar mejor los picos notando que no hubo ningún cambio significativo. Debido a ello, se tomó la decisión de variar la proporción de fase móvil. Se hicieron entonces varias corridas con porcentajes desde 90% agua y 10% acetonitrilo hasta 40% agua y 60% acetonitrilo sin añadir ácido acético en el agua. La opción de aumentar el agua no era factible ya que la capsicina no es soluble en agua y por consecuencia los capsicinoides no se diluían en la fase móvil. Por esta razón no se logró una separación de los picos en el cromatograma. Finalmente se concluyó que la mejor fase móvil era la que contenía 60% agua, 40% acetonitrilo y 1% de ácido acético en el agua a un flujo de 0.80 ml/min con un tiempo de corrida de 10 min. A efecto de obtener una mejor resolución de los picos se hicieron diluciones de las muestras puesto a que se dedujo que la concentración de capsicinoides en los extractos era muy alta y no se definían bien como ya se había observado. Con base a esta experimentación, el método que se propone para la determinación de capsicinoides es el siguiente:

Materiales:

- HPLC.
- Columna de acero inoxidable, C<sub>18</sub>, 150 x 4.6 mm id, empacada con un diámetro de partícula de 5 mm.
- Filtro de membrana de celulosa de 47 mm de diámetro y 0.47 µm de poro (Agilent Technologies)

- Filtros para jeringa (aerodisk) de celulosa regenerada, con filtro de polipropileno. Diámetro interno de 13 mm, volumen de 1-10. Tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies).
- Tubos ependor.
- Agua grado HPLC (EMP).
- Ácido acético grado HPLC o al 100% (Merck).
- Acetonitrilo grado HPLC (EMP).
- Etanol grado HPLC o al 100%.
- Capsicina natural. (Natural capsaicin, Sigma Aldrich).

Para hacer la solución estándar de capsicina natural:

- Se toman 75 mg de capsicina natural (65% capsicina, 30% dihidrocapsicina y 5% nordihidrocapsicina) y se ponen en un matraz aforado de 500 ml.
- Se lleva a volumen con etanol.
- Se toman 10 ml de la solución estándar y se llevan a volumen en un matraz aforado de 100 ml.
- Se mide 1 ml de la solución estándar anterior y se añaden 10 ml de fase móvil. (60% agua con 1% de ácido acético (v/v) y 40% acetonitrilo)
- Con la solución anterior se hacen diluciones con la fase móvil hasta llegar a una dilución 3:3
- Se coloca la dilución 3:3 en tubos ependor y se guarda para la determinación.

Se deberá realizar un tratamiento a las muestras antes de inyectar en el HPLC por dos razones: primero porque se pueden presentar interferencias en la determinación debido a: 1) dentro del extracto se encuentran también terpenos (carotenoides) y esteroides y 2) las muestras se encuentran muy concentradas lo que ocasiona que la detección se vuelva imprecisa ver anexo D donde se muestran los cromatogramas a distintas concentraciones de muestra. Para realizar las diluciones se tomó como referencia Peusch y col. (1997); quienes reportan que se debe disolver el extracto con fase móvil de la siguiente manera.

- Se filtra la muestra a vacío por medio de un filtro de membrana.
- Se toma 1 ml de la muestra y se agregan 10 ml de la fase móvil.
- Se hacen diluciones con la solución anterior hasta que se obtenga una dilución de 6:6.
- Se filtra la última dilución con un filtro para jeringa (aerodisk) y se coloca en un tubo ependor para su análisis.

Para inyectar las muestras de extracto de capsicina diluidas se siguió el procedimiento de la AOAC. (1999) sin embargo experimentalmente se cambio el flujo a 0.8 ml/min para que así los picos de los analitos se separen y se pueda realizar la determinación cuantitativa de los capsicinoides; para ver cromatogramas a diferentes flujos consultar el anexo D.

- Se inyectan 50  $\mu$ l de la solución estándar diluida.
- Se inyectan por duplicado 50  $\mu$ l de la solución problema diluida.
- Después de 30 inyecciones, purgar la columna durante 30 minutos con acetonitrilo al 100% a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min.
- Al inyectar la muestra se obtendrá un cromatograma con 3 picos donde el primer pico corresponde a la nordihidrocapsicina, el segundo a la capsicina y el tercero a la dihidrocapsicina.