

Determinación de capsaicina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA) en la especie *Capsicum frutescens*

Determination of capsaicin by high performance liquid chromatography (HPLC-PDA) in the species *Capsicum frutescens*

Marcela Villalba Cadavid¹, Guillermo Arrázola Paternina¹, Enrique Pardo Perez²

¹Universidad de Córdoba, Facultad de Ingenierías, Programa de Ingeniería de Alimentos. Montería, Colombia.

²Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología. Montería, Colombia.

Resumen

En este estudio se presenta la extracción, identificación y cuantificación de Capsaicina presente en la oleorresina del fruto de la especie *Capsicum Frutescens*. La extracción de la oleorresina se realizó mediante una técnica conocida como Soxhlet; la identificación y cuantificación de Capsaicina se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA), para la identificación fue necesario comparar los tiempos de retención de la oleorresina con un estándar de Capsaicina y la cuantificación se realizó por medio de una curva de adición estándar. Los resultados muestran que la Capsaicina presentó una fuerte absorción a una longitud de onda de 280 nm. Se logró identificar la Capsaicina en la oleorresina mostrando un tiempo de retención de 0,997 min. De la curva de calibración se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9994 mostrando la bondad del ajuste de los datos. Es evidente, que el método desarrollado permite claramente la separación y cuantificación de Capsaicina; logrando así, aprovechar su uso a nivel comercial en la industria alimentaria y farmacológica.

Palabras claves: Capsaicina, oleorresina, Soxhlet, cromatografía de alta resolución.

Abstract

This study presents the extraction, identification and quantification of Capsaicin present in the oleoresin of the fruit of the *Capsicum Frutescens* species. The extraction of the oleoresin was performed by a technique known as Soxhlet. The identification and

quantification of Capsaicin was carried out by means of high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-PDA), for the identification, it was necessary to compare the retention times of the oleoresin with a Capsaicin standard and the quantification was performed by Half of a standard addition curve. The results show that Capsaicin showed strong absorption at a wavelength of 280 nm. Capsaicin was identified in the oleoresin showing a retention time of 0.997 min. From the calibration curve, a determination coefficient of 0.9994 was obtained showing the goodness of the fit of the data. Is evident that the method developed clearly allows the separation and quantification of Capsaicin; Thus, taking advantage of its commercial use in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: Capsaicin, oleoresin, Soxhlet, high performance liquid chromatography.

Introducción

Los ajís picantes se han convertido en uno de los agregados más utilizados en la cocina a nivel mundial; además de ser valorado por sus diferentes atributos como el sabor, color, pungencia y olor ¹. La pungencia de esta fruta es originada por un grupo de amidas que surgen de la vanillilamida y que son conocidas como capsaicinoides ². Los capsaicinoides son los componentes responsables del sabor picante de muchas variedades de ají, existen dos capsaicinoides en mayor cantidad como son la Capsaicina (trans-8-metil-N-vallinil-6-noneamida) y la dihidrocapsaicina (8-metil-N-vallinil-6-noneamida) y en menor proporción se encuentran nonivamida, nornorcapsaicina norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, entre otros ^{1,3}.

Debido al grado de pungencia se presentan una gran variedad de ajíes, en especial el género *Capsicum* es el más estudiado debido a sus propiedades pungentes; su origen procede de regiones tropicales y subtropicales de América específicamente de países como Bolivia y Perú, donde se han hallado semillas ancestrales de más de 7000 años ⁴⁻⁶. El género *Capsicum* comprende cerca de 60 especies de las cuales solo cinco han sido domesticadas entre estas se encuentran: *C. chinense*, *C. annum*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. frutescens*; este último, es el elemento principal de estudio en esta investigación ⁷⁻⁹.

El ají además de ser importante como alimento, también se ha reportado que la especie *C. frutescens* se ha utilizado como medicamento; tal es el caso de ungüentos, que producen la secreción del neurotransmisor P desde el hipotálamo reduciendo la sensación del dolor, aliviando el dolor de cabeza y de garganta; además, de actuar como antibióticos frenando el ingreso de patógenos que generan alergias. También se ha encontrado que presenta propiedades, antioxidantes, quimiopreventivas, anticancerígenas, y antiinflamatorias ¹⁰⁻¹³.

Se han reportado diversos estudios sobre métodos analíticos para la separación y cuantificación de Capsaicina. De todos los métodos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha demostrado ser una de las más sensible y eficiente ^{14,15}. Es de señalar que no existen estudios de extracción, separación y cuantificación de Capsaicina en la especie *C. frutescens* por HPLC en la localidad de Montería-Colombia. Por tanto, este trabajo tiene como objetivo extraer y cuantificar Capsaicina en una muestra de ají de la especie *Capsicum Frutescens* de la localidad de Montería-Colombia, utilizando cromatografía líquida de alta resolución y un detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA).

Materiales y Métodos

Muestra y Reactivos

La muestra de ají (*Capsicum Frutescens*) se obtuvo del mercado local de la ciudad de Montería-Colombia, los frutos fueron seleccionados de acuerdo a criterios de calidad como el color y olor; además, antes del proceso de extracción fue necesario eliminar los péndulos del fruto. El solvente utilizado para la extracción por el método convencional Soxhlet fue hexano de grado reactivo. Para la identificación y cuantificación de Capsaicina por HPLC-PDA se implementó un estándar de Capsaicina y como solventes acetonitrilo y agua, los reactivos fueron de grado HPLC y se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Extracción

El solvente de extracción Soxhlet fue hexano. El fruto fue secado a 60 °C durante 42 horas en un horno de convección Práctica Technicook y luego se molió hasta conseguir la forma de escamas. Se transfirió 4,0058 g a un dedal de celulosa, el cual posteriormente

fue sometido a un tiempo de extracción de 3 horas. El solvente orgánico fue recuperado haciendo uso de un rotaevaporador y el solvente residual fue eliminado a una temperatura de 50°C durante 6 horas. El balón con el extracto fue llevado a un desecador para alcanzar un peso constante y finalmente se determinó el rendimiento de la extracción. El balón con el extracto se envolvió con papel aluminio para evitar la fotodegradación de la Capsaicina.

Caracterización

La oleorresina extraída se le adicionó 5 ml de acetonitrilo, luego se agregó 10 ml con el fin de disolver el extracto completamente. Tanto el estándar, como la muestra de Capsaicina fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA) marca Accela.

La fase móvil fue constituida a partir de una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción 35:65 respectivamente. Como fase estacionaria se hizo uso de una columna de fase reversa Hypersil Gold, C18 de 50 x 2,1 mm y 1,9 µm tamaño de partícula, el volumen de inyección fue de 2 µL. Las lecturas se llevaron a cabo a una longitud de onda de 280 nm. Para el análisis de la muestra fue necesario diluir la muestra extraída en acetonitrilo con una relación 1:11. En el caso de la cuantificación se pesó 0,008 g de estándar y se disolvió en un volumen final de 50 ml con acetonitrilo, para obtener una solución final de 160 mg/l (solución madre). Para el diseño de la curva de calibración se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI y concentraciones del estándar de 5, 10, 40, 70, 100, 130 y 160 mg/l.

Resultados y Discusión

Extracción

Luego de la descarga y recuperación del solvente en el equipo Soxhlet, los balones con la oleorresina fueron pesados para determinar el rendimiento de extracción. Encontrándose, un rendimiento de 2,42% valor inferior a lo reportado por algunos autores (Ecuación 1) ^{16,17}.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Extracto (g)}}{\text{Muestra (g)}} * 100 = \frac{0,0971 \text{ g}}{4,0058 \text{ g}} * 100 = 2,42\% \text{ (Ecuación 1)}$$

Lo anterior puede estar asociado a las características fisicoquímicas del suelo y a la diferencia de altitud con la zona de origen de la especie.

Caracterización

La fase móvil implementada logró resolver el pico de Capsaicina con buena resolución en un tiempo inferior de 2 minutos (Figuras 2 y 3); así, el tiempo de análisis fue menor en comparación con métodos de separación reportados en la literatura ^{18,19}. Los cromatogramas propios del estándar de Capsaicina y de la muestra de oleoresina extraída de *C. frutescens*, se observan en la Figura 1 y en la Figura 2 respectivamente.

El pico que se observa en la Figura 2 a un tiempo de retención de 1,518 minutos, puede corresponder a la dihidrocapsaicina que generalmente se eluye a tiempos muy cercanos a la Capsaicina. También, se muestra un pico intenso situado a un tiempo de análisis de 0,260 minutos, lo cual puede estar asociado a la presencia de pigmentos como carotenoides.

Además, se puede observar que el análisis de separación de Capsaicina presente en el ají fue eficiente, logrando resolver todos los picos, no obstante se puede notar que el tiempo de retención de la muestra (Figura 2) es mayor que el tiempo del estándar (Figura 1); esto puede ser ocasionado por la presencia de otros componentes que interfieren en el proceso de separación de la Capsaicina, pero por su cercanía con el pico del estándar se puede corroborar la presencia de Capsaicina en la muestra vegetal.

Linealidad y rango

Partiendo de las disoluciones del estándar descrito en el apartado experimental y su posterior inyección en el HPLC por triplicado, se obtuvo para cada una de las concentraciones: el área de los picos, área promedio y tiempo de retención (Tabla 1).

A partir de los valores del área promedio de los picos y de la concentración, se llevó a cabo el análisis de regresión lineal simple, donde se obtuvo la relación de linealidad entre la concentración y la señal dada por el equipo ($y = 8991,48x - 4434,53$), con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0,9994$ (Figura 3) demostrando así la bondad del ajuste y la relación fuerte entre la respuesta del equipo y la concentración del analito;

además de confirmar con el valor de la pendiente la buena sensibilidad del método de cuantificación de Capsaicina. Por tanto, al aplicar el método se siguió la linealidad en un rango de concentraciones de 5-160 mg/L.

Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville (SHU)

Con el fin de establecer la calidad de la fruta desde el punto de vista de pungencia, fue necesario determinar el nivel de pungencia en Unidades Scoville. Lo anterior se hizo capturando el valor del área promedio de la muestra (Tabla 1) y su remplazo en la ecuación de la recta ajustada (Figura 3), con esto se encontró la concentración de Capsaicina en el extracto (oleorresina), consiguiéndose un valor de 785,73 mg/L. Este valor puede ser convertido rápidamente a Unidades Scoville teniendo en cuenta que una parte por millón de Capsaicina equivale a 16,10 SHU de Capsaicina pura. Por tanto, se determinó un valor de 12650,25 SHU para la oleorresina de la muestra vegetal, exhibiendo así un grado de picor medio o moderado según la tabla 2²⁰. No obstante, el grado de pungencia de la especie *C. frutescens* puede establecerse en rango de altamente picante como generalmente se encuentra asociado en algunos estudios¹⁷; esto por el hecho, que en esta investigación no se tienen en cuenta otros tipos de capsaicinoides que aportan picor al fruto.

Por lo cual, los resultados anteriores indican que el picor medio del fruto estudiado, se debe a la contribución de la concentración de Capsaicina en el vegetal.

Conclusiones

La metodología de extracción por Soxhlet muestra una alternativa confiable para la obtención de Capsaicina.

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector PDA permite: separar, identificar y cuantificar Capsaicina, mostrando ser hasta este punto un método idóneo para este propósito; aunque, es necesario determinar otros parámetros para validar el método.

En cuanto el nivel de pungencia de Scoville, la especie *C. frutescens* presentó un nivel medio de picor o posiblemente un nivel picante para el caso del estudio de otros

capsaicinoides, representando un gran potencial para su aplicación en el sector de alimentos.

Referencias bibliográficas

1. Giuffrida D, Dugo P, Torre G. *et al.* Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. *Food Research International*. 2014, 65, p. 163-170.
2. Peña A, Ramírez E, Alvarado LA. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216:2843-2847.
3. Bajer T, Bajerová P, Kremr D. *et al.* Central composite desing of pressurised hot water extraction process for extracting capsainoids from chili peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;40:32-38.
4. Martínez G. Análisis de agro negocios alianza productiva y comercial ají. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Corpocauca. 2005, p. 12-13.
5. Gómez JA, Vargas LY, Sanabria F. Los capsaicinoides presentes en el cultivo de ají como estimulante del sistema inmunológico en aves. *USTA*, 2013, p. 21-36.
6. Barceloux DG. Pepper and capsaicin (*Capsicum* and *piper* species). *Disease a Month*. 2009;55:380-390.
7. Yanéz P, Balseca D, Rivadeneira L. *et al.* Características morfológicas y de concentración de Capsaicina en cinco especies nativas del genero *Capsicum* cultivadas en ecuador. *La granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 2015;22:12-32.
8. Giuffrida D, Dugo P, Torre G. *et al.* Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*. 2013;140:794-802.
9. Cázares E, Ramírez P, Castillo F. *et al.* Capsaicinoids and preference of use in different morphotypes of chili peppers (*Capsicum annuum L.*) of east-central Yucatán. *Agrociencia*. 2005;39:627-638.
10. Barbero GF, Ruiz AG, Liazid A. *et al.* Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum L.*). *Food Chemistry*. 2014;153:200-206.

11. Hayman M, Kam PCA. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2008;19:338-343.
12. Szolcsányi J. Review: Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 2004;38:377-384.
13. Chinn MS, Sharma RR, Cotter JL. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *capsicum chinense*. *Food and Bioproducts Processing*. 2011;89:340-345.
14. Barbero GF, Liazid A, Palma M. *et al.* Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chemistry*. 2008;107:1276-1282.
15. Zhang Q, Hu J, Sheng L. *et al.* Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2010, 878, p. 2292-2297.
16. Restrepo M, Llano N, Fonseca CE. Composición de las oleorresinas de dos variedades de ají picante (habanero y tabasco) obtenidas mediante lixiviación con solventes orgánicos. *Revista Lasallista de Investigación*. 2007;4:14-19.
17. Fernández G, Palma M, Barroso CG. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2006;57(8):227-233.
18. Sganzerla M, Coutinho JP, Godoy H. *et al.* Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum Chinense* fruits. *Food Research International*. 2014;64:718-725.
19. Singh S, Jarret R, Russo V. *et al.* Determination of capsinoids by HPLC-DAD in *capsicum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57:3452-3457.
20. Al ZA, Hadj YB, Habila MA. *et al.* Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*. 2011;16:8919-8929.

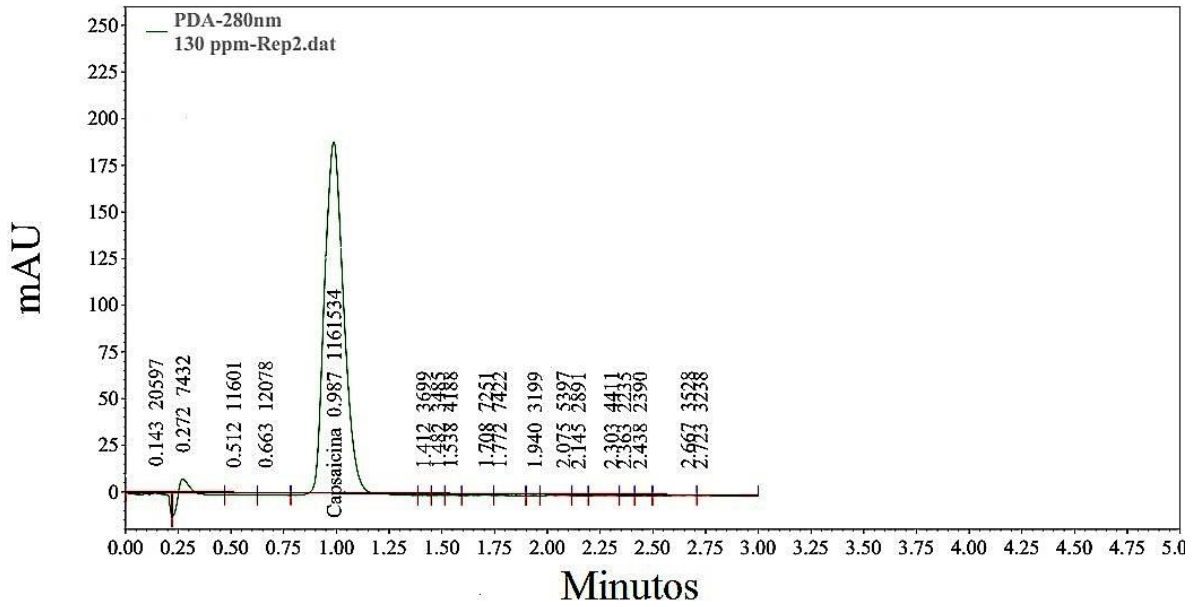


Figura. 1. Cromatograma típico del estándar de Capsaicina 130 mg/l.

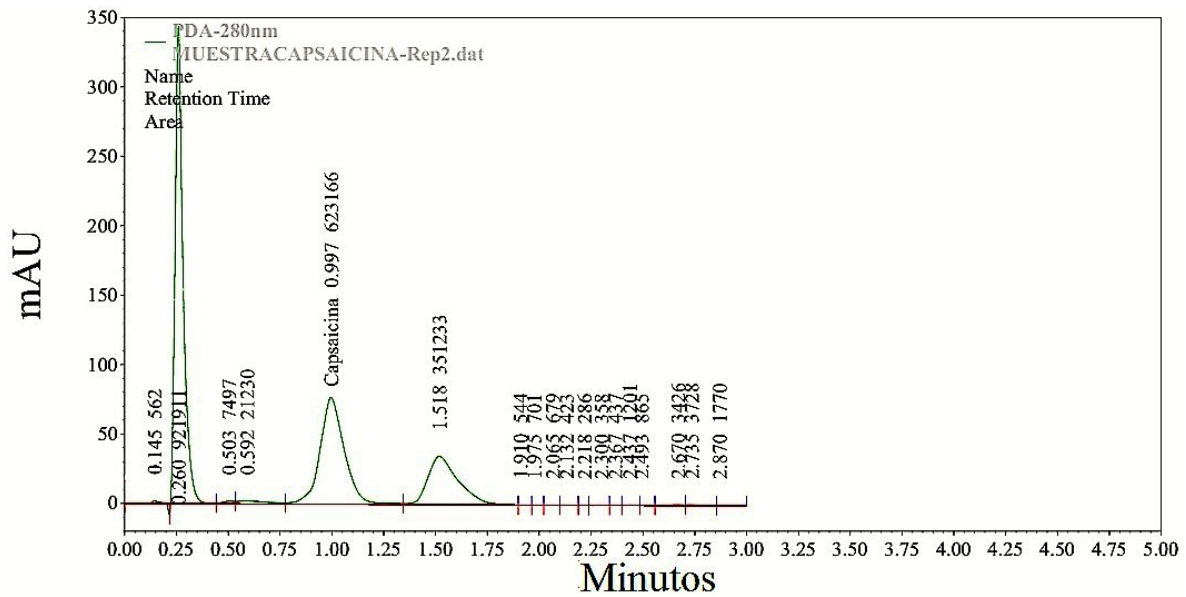


Figura. 2. Cromatograma obtenido de la oleorresina del fruto.

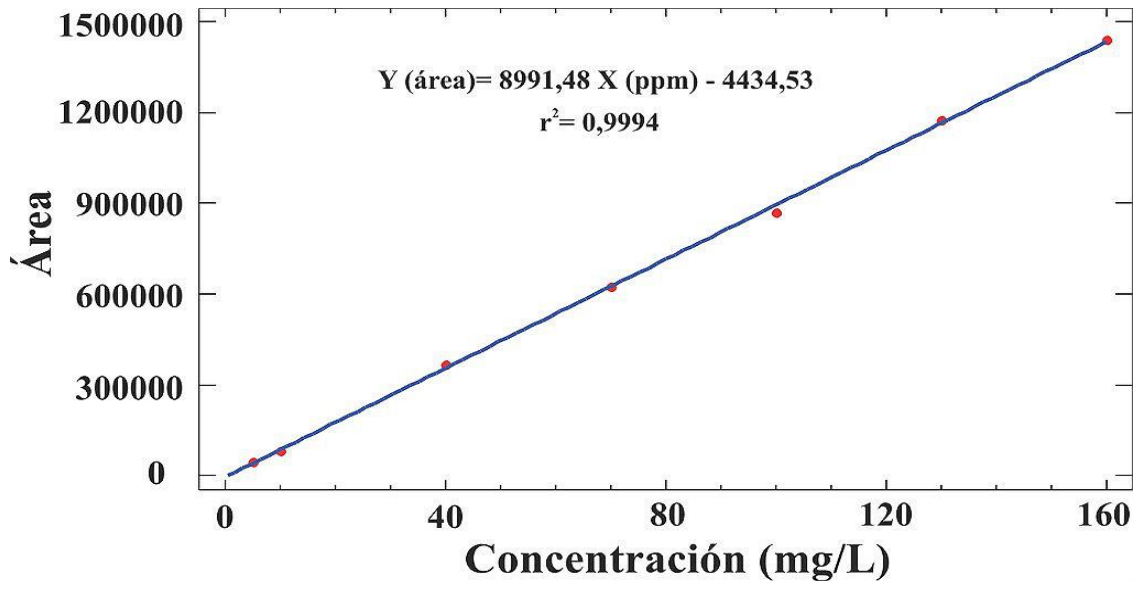


Figura. 3. Curva de calibración para el estándar de Capsaicina.

Tabla. 1. Área de los picos del estándar de Capsaicina.

Concentración de Capsaicina (ppm)	Respuesta analítica del HPLC (área)					
	A1	A2	A3	ATotal	AProm	T _{Ret} (min)
5	42940	44761	46857	134558	44853	0,987
10	78919	79180	84359	242458	80819	0,987
40	363560	373354	365090	1102004	367335	0,987
70	629741	630428	606700	1866869	622290	0,987
100	871333	886071	852287	2609691	869897	0,987
130	1193652	1161534	1168665	3523851	1174617	0,987
160	1344016	1484133	1491121	4319270	1439757	0,987
Muestra	651766	623166	638443	1913375	637792	0,987

Tabla. 2. Unidades de picor Scoville.

Pungencia	Unidades Scoville
No picante	0-700
Ligeramente	700-3000
Moderadamente	3000-25000
Altamente	25000-70000
Muy picante	>80000