

EXTRACCIÓN DE CAPSAICINA C₁₈H₂₇NO₃ MÉTODOS: DE MACERACIÓN Y FLUIDO SUPERCRÍTICO

Fitoquímica experimental ají rojo y amarillo especie *capsicum baccatum*
Municipios de Padilla y Huacareta, departamento de Chuquisaca-Bolivia

EXTRACTION OF CAPSAICIN C₁₈H₂₇NO₃
METHODS: MACERATION AND SUPERCRITICAL FLUID

Experimental phytochemistry red and yellow chili peppers, capsicum baccatum species,
Municipios de Padilla y Huacareta, departamento de Chuquisaca-Bolivia

Celia Evelyn Terrazas Alacoria*, Eliana Patricia Duchén Uriarte **, Santiago Tarqui Tarqui***

RESUMEN	ABSTRACT	RESUMO
<p>El artículo hace referencia a extracciones de capsaicina (C₁₈H₂₇NO₃) por métodos de maceración y fluido supercrítico, sobre fitoquímica experimental de ají rojo y amarillo especie <i>Capsicum baccatum</i>, originarias de Padilla y Huacareta, ambas regiones geográficas de Chuquisaca-Bolivia.</p> <p>Para cuantificación de materia capsaiconoides por maceración (extracción convencional) se utilizó espectrofotometría UV-VIS. Respecto a la capsaicina obtenida por ambos métodos, la cuantificación fue a través de cromatografía líquida de alta eficacia HPLC. En ambos métodos de extracción, se trabajó por separado la pulpa y semillas (pepas); obteniendo así, la oleoresina de extracción respectiva. La espectroscopia RMN, permitió determinar una importante similitud teoría-análisis para el isómero Trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida (capsaicina C₁₈H₂₇NO₃).</p> <p>Estableciendo para la maceración alcohólica los parámetros de operación; tamaño de partícula y tiempo de extracción (mejor resultado ají amarillo pulpa). Respecto a la extracción por fluido supercrítico los parámetros corresponden a la presión 2700 PSI y temperatura 45°C, (mejor resultado semilla ají rojo).</p> <p>PALABRAS CLAVE: Ají; capsaicina, extracción por fluidos supercríticos, método de maceración alcohólica.</p> <p>History of the article: Received: 15/11/2014. Style review: 29/11/2024. Accepted: 06/12/2024.</p>	<p>The article refers to capsaicin (C₁₈H₂₇NO₃) extractions by maceration and supercritical fluid methods, on experimental phytochemistry of red and yellow chili peppers of the <i>Capsicum baccatum</i> species, originating from Padilla and Huacareta, both geographic regions of Chuquisaca-Bolivia.</p> <p>UV-VIS spectrophotometry was used to quantify capsaicinoid matter by maceration (conventional extraction). Regarding the capsaicin obtained by both methods, quantification was done through high-performance liquid chromatography HPLC. In both extraction methods, the pulp and seeds (seeds) were processed separately; thus, the respective extraction oleoresin was obtained. NMR spectroscopy allowed determining an important theory-analysis similarity for the isomer Trans-8-methyl-N-vanillyl-6-noneamide (capsaicin C₁₈H₂₇NO₃).</p> <p>Establishing the operating parameters for alcoholic maceration; particle size and extraction time (best result yellow chili pulp). Regarding supercritical fluid extraction, the parameters correspond to pressure 2700 PSI and temperature 45°C, (best result red chili seed).</p> <p>KEYWORDS: Chili; capsaicin, supercritical fluid extraction, alcoholic maceration method.</p>	<p>O artigo refere-se às extrações de capsaicina (C₁₈H₂₇NO₃) por métodos de maceração e fluido supercrítico, na fitoquímica experimental das espécies de pimenta vermelha e amarela <i>Capsicum baccatum</i>, originárias de Padilla e Huacareta, ambas regiões geográficas de Chuquisaca-Bolivia.</p> <p>Para a quantificação da matéria capsaiconóide por maceração (extração convencional), utilizou-se a espectrofotometria UV-VIS. Em relação a capsaicina obtida por ambos os métodos, a quantificação foi através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em ambos os métodos de extração, a polpa e as sementes (sementes) foram processadas separadamente; obtendo assim a respectiva oleoresina de extração. A espectroscopia de RMN nos permitiu determinar uma importante similaridade teoria-análise para o isômero Trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida (capsaicina C₁₈H₂₇NO₃). Estabelecer os parâmetros de funcionamento da maceração alcoólica; tamanho de partícula e tempo de extração (melhor resultado de polpa de pimenta amarela). Quanto à extração por fluido supercrítico, os parâmetros correspondem à pressão 2700 PSI e temperatura 45°C, (melhor resultado semente de pimenta vermelha).</p> <p>PALAVRAS-CHAVE: Pimentão; capsaicina, extração com fluido supercrítico, e maceração alcoólica.</p>

INTRODUCCIÓN

La capsaicina¹ C₁₈H₂₇NO₃ (trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida - IUAPAC), es un alcaloide natural que se extrae, tratando los frutos secos de plantas del género *capsicum* (pimientos picantes).

Procedimientos de extracción

Los extractos² se pueden obtener mediante un proceso de maceración en disolventes orgánicos a partir de plantas o frutos molidos y secos.

La desventaja de los disolventes orgánicos, está en su separación incompleta del producto final, además durante ciertos procesos, la alta temperatura de operación puede provocar que otros compuestos acompañantes se desnaturalicen. [1]

Frente a esta limitación, ha surgido un procedimiento de extracción libre de disolventes relacionado con el uso de fluidos supercríticos. Entre los que destaca el dióxido de carbono³ ($t = 31,21^\circ\text{C}$, $P = 7,38 \text{ MPa}$).

En consecuencia, el trabajo experimental presente tuvo como objetivo evaluar el rendimiento de extracción de la capsaicina, comparando un método convencional con la extracción por fluido supercrítico⁴ a nivel laboratorio. Aplicada a la fitoquímica de dos variedades de ají rojo y amarillo pertenecientes al género *Capsicum baccatum*. Procedentes de las localidades de Padilla, y Huacareta, Departamento de Chuquisaca-Bolivia.

Estableciendo como variables operacionales para el proceso de maceración: el tamaño de partícula y el tiempo de extracción, y para el proceso de extracción por fluidos supercríticos: los efectos de la presión y temperatura.

¹ El compuesto de la familia de los vainillones conocido comúnmente como capsaicina químicamente es un sólido hidrofóbico, incoloro, muy picante, de aspecto blanco ceroso. Se utiliza tópicamente para aliviar el dolor. Actúa uniéndose a receptores TRPV (Receptor Transitorio Sensible a los Vainillones). Canales iónicos que participan en la percepción de la temperatura, el dolor, secreción salival y otras funciones celulares. Tiene efectos analgésicos al inhibir receptores TRPV por aplicación repetida sobre la piel. Capsaicin <https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Capsaicin>

² Extractos principalmente utilizados como saborizantes, colorantes, esencias, entre otros.

³ El dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) también es atractivo debido a su alta difusividad combinada con su resistencia a los disolventes fácilmente ajustable. Otra ventaja es que el dióxido de carbono (CO₂) es gaseoso a temperatura y presión ambiente, lo que hace que la recuperación de extractos sea muy simple y proporciona extractos sin disolventes. [2]

⁴ Condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico, donde una sustancia o compuesto no tiene definido su comportamiento puro como gas o como líquido puro (desapareciendo las fases), pero presenta propiedades de ambos estados de agregación.

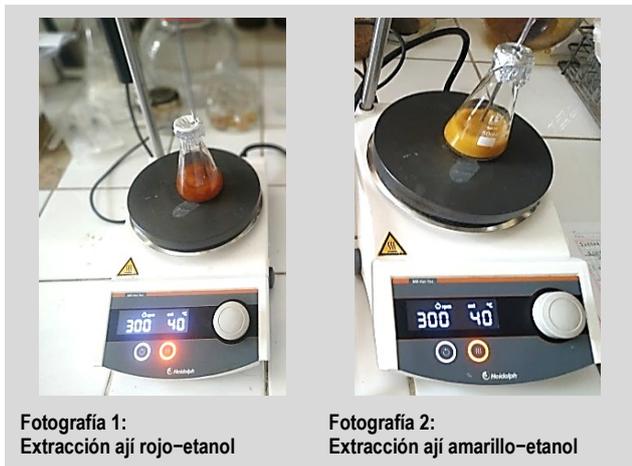
DESARROLLO

a) Muestreo y preparación

Se colectaron dos variedades de ají de la especie *Capsicum baccatum* en los Municipios Padilla y Huacareta del departamento de Chuquisaca. Primeramente, se realizó la limpieza de las muestras seguido de la separación de la pulpa y pepa, a continuación, las muestras se secaron a temperatura de 45 ± 3 °C en un secador de bandejas, por un tiempo aproximado de 1 h, finalmente se realizó la molienda y tamizado.

b) Extracción por maceración

Se pesaron muestras⁵ por triplicado de ají molido y tamizado tamaños de partícula: 250, 600 y 1700 μm , llevando éstas a matraces en Erlenmeyer. Para la extracción se utilizó como solvente etanol de 96 °GL, con una relación de 1:10 masa: solvente (gramo: mililitro), a temperatura de 40 °C, y agitación constante de 300 rpm, durante los tiempos correspondientes (1, 2, 3 y 4 horas). Ver fotografías 1 y 2.



Fotografía 1:
Extracción ají rojo-etanol

Fotografía 2:
Extracción ají amarillo-etanol

c) Extracción por fluido supercrítico

De acuerdo con la capacidad del recipiente de extracción del equipo SFE - CO₂ que utiliza como solvente el dióxido de carbono presurizado, las muestras de ají tuvieron un peso de $25 \pm 0,1$ g (fotografía 3).



Fotografía 3: Equipo de extracción SFE - CO₂

⁵ $2,00 \pm 0,01$ gramos por muestra.

Procedimiento efectuado por duplicado para todas las muestras de ají, tomando en cuenta el rango de operación: presión: 13,8 a 18,6 MPa, y temperatura 35 a 45 °C.

d) Análisis cuantitativo:

d.1) Espectrofotometría UV-Visible Sustancias capsacionoides⁶

Se efectuaron barridos espectrales para cada extracto con el espectrofotómetro UV-Vis Spectroquant Pharo 300. Definiendo los parámetros en modo Spectrum con lámpara flash de xenón, entre longitud de onda 200 – 400 nm.

Para obtener la curva de calibración se preparó soluciones estándar de capsaicina Sigma-Aldrich $\geq 95,0$ por ciento, concentraciones de: 5, 10, 15, 20 y 25 [ppm]. Posterior se prepararon soluciones del extracto de capsaicina obtenido por maceración a 200 [ppm], empleando etanol como solvente.

d.2) cuantificación mediante cromatografía líquida de alta eficacia HPLC⁷

Para la cuantificación de capsaicina, se utilizó el equipo HPLC Agilent 1100 SERIES empleando una columna de fase reversa Eclipse Plus C18 de 4,6 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula, volumen de inyección de 25 μL , detector diodos DAD a una longitud de onda de 280 nm.

Se efectuó la preparación de estándares de capsaicina Sigma-Aldrich $\geq 95,0$ por ciento HPLC a las concentraciones de 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 [ppm] para efectuar la curva de calibración y para las cuantificaciones de los extractos obtenidos por el método convencional se preparó soluciones de 4000 ppm en el caso de los extractos de las pulpas de ají y 3000 ppm para los extractos de las semillas; por otro lado, para cuantificar la capsaicina de los extractos obtenidos por fluidos supercríticos se preparó soluciones de 2500 ppm de las pulpas de ají y 1500 ppm para los extractos de las semillas.

e) Análisis estadístico: Tamaño de partícula, tiempo de extracción y rendimiento

Para analizar el efecto de la influencia del tamaño de partícula y del tiempo de extracción, en el rendimiento de obtención de capsaicina para ambas variedades de ají por el método de maceración, primero se evaluó la normalidad de los rendimientos aplicando el análisis estadístico descriptivo y la homogeneidad de varianzas (prueba de Leven). Mediante las pruebas se determinó que los resultados no sigan la distribución normal, (prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas) a un nivel de significancia de 0,05. Todas las pruebas estadísticas y gráficos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics 25.

⁶ Capsaicina (~69%) e dihidrocapsaicina (~22%), componentes principales de los frutos de capsicum (ají), responsables junto a otros del nivel de pungencia (picor) que caracteriza a estos metabolitos. [3]

⁷ El cromatógrafo cuenta con una bomba cuaternaria, siendo la fase móvil empleada una mezcla de acetonitrilo y agua (0,1 por ciento de ácido fórmico) en proporción 50:50 respectivamente a un flujo de 1, mL por minuto.

f) Resultados

En las tablas 1 y 2 se muestran los análisis ponderales de capsaicina tanto para la extracción por maceración con agitación magnética y por fluido supercrítico (CO₂), destacando las condiciones experimentales y la parte del fruto que permiten obtener una mayor cantidad de capsaicina.

Tabla 1
Cuantificación de capsaicina HPLC⁸
Extractos obtenidos por maceración y agitación magnética (3 a 4 horas)

Variedad	Parte fruto	Tamaño (mm)	Tiempo (Horas)	mg C ₁₈ H ₂₇ NO ₃ /g de ají
Ají Rojo	Pulpa	250	3	0,76 ± 0,003
Ají Rojo	Pulpa	250	4	0,85 ± 0,004
Ají Rojo	Pulpa	600	3	0,40 ± 0,002
Ají Rojo	Pulpa	600	4	0,47 ± 0,002
Ají Rojo	Pepa	250	3	0,62 ± 0,001
Ají Rojo	Pepa	250	4	0,71 ± 0,002
Ají Rojo	Pepa	600	3	0,19 ± 0,001
Ají Rojo	Pepa	600	4	0,24 ± 0,002
Ají Amarillo	Pulpa	250	3	0,79 ± 0,004
Ají Amarillo	Pulpa	250	4	0,88 ± 0,003
Ají Amarillo	Pulpa	600	3	0,47 ± 0,001
Ají Amarillo	Pulpa	600	4	0,50 ± 0,007
Ají Amarillo	Pepa	250	3	0,50 ± 0,002
Ají Amarillo	Pepa	250	4	0,60 ± 0,002
Ají Amarillo	Pepa	600	3	0,15 ± 0,001
Ají Amarillo	Pepa	600	4	0,18 ± 0,002

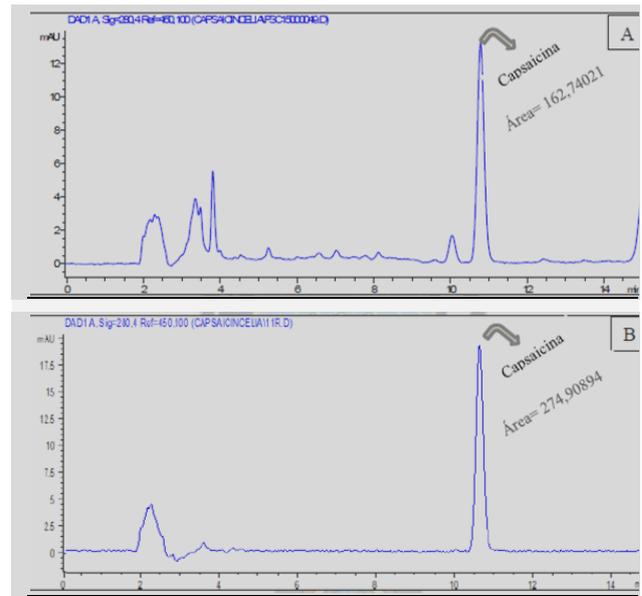
Fuente: Elaboración propia

Tabla 2
Cuantificación de capsaicina HPLC
Extractos obtenidos por fluido supercrítico

Variedad	Fruto Tipo	Presión (PSI)	Temp. (°C)	mg C ₁₈ H ₂₇ NO ₃ /g de ají
Ají Rojo	Pulpa	2000	35	0,06 ± 0,000
Ají Rojo	Pulpa	2000	45	0,56 ± 0,000
Ají Rojo	Pulpa	2700	35	0,20 ± 0,000
Ají Rojo	Pulpa	2700	45	1,01 ± 0,007
Ají Rojo	Pepa	2000	35	0,50 ± 0,001
Ají Rojo	Pepa	2000	45	1,21 ± 0,008
Ají Rojo	Pepa	2700	35	0,88 ± 0,017
Ají Rojo	Pepa	2700	45	2,73 ± 0,008
Ají Amarillo	Pulpa	2000	35	0,05 ± 0,001
Ají Amarillo	Pulpa	2000	45	0,55 ± 0,005
Ají Amarillo	Pulpa	2700	35	0,09 ± 0,000
Ají Amarillo	Pulpa	2700	45	1,00 ± 0,004
Ají Amarillo	Pepa	2000	35	0,43 ± 0,004
Ají Amarillo	Pepa	2000	45	0,90 ± 0,000
Ají Amarillo	Pepa	2700	35	0,48 ± 0,017
Ají Amarillo	Pepa	2700	45	2,01 ± 0,000

Fuente: Elaboración propia

La figura 1, muestra en los cromatogramas HPLC las áreas que caracterizan la cuantificación de capsaicina. Aplicando el procedimiento extractivo por fluido supercrítico (CO₂).

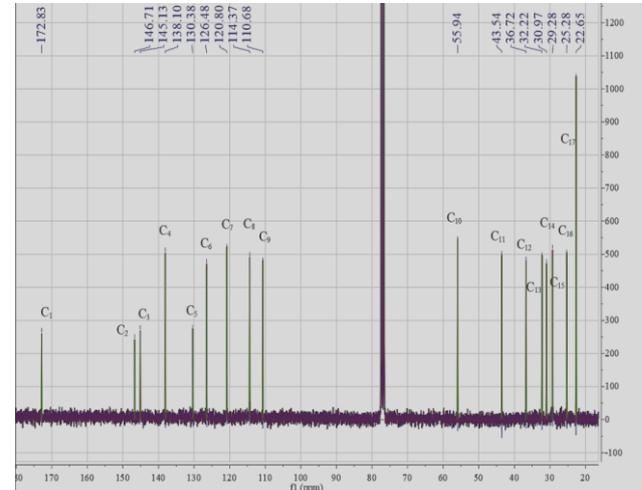


Fuente: Elaboración propia

Figura 1: Cromatogramas HPLC extracción por fluido supercrítico, (A) pulpa ají rojo, (B) semilla ají rojo

f.1) Identificación de capsaicina por Resonancia Magnética Nuclear RMN⁹

La figura 2, corresponde al espectrograma RMN ¹³C, que identifica señales de carbono para una muestra de alta pureza de capsaicina (espectrograma teórico) y la comparación con el material separado en el procedimiento experimental (espectrograma de análisis)



Fuente: Espectrograma RMN

Figura 2: Espectro de carbono capsaicina de análisis en CDCl₃ RMN a 75 MHz Avance II (Bruker)

En la tabla 3 se presenta el comparativo de señales de carbono teórico y de análisis, además de una explicación de la estructura de mayor estabilidad para el isómero trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida (capsaicina).

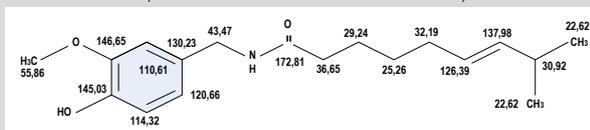
⁸ High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia o resolución), procedimiento separativo que fuerza el paso de un líquido a través de una columna rellena de material sólido finamente dividido y estacionario que permite una mejor separación de solutos (zonas de acumulación mayor) y en menor tiempo.

⁹ Señales de protón: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28, 6.90, 6.87, 6.82, 6.80, 6.77, 5.62, 5.38, 5.36, 5.35, 5.33, 4.39, 4.37, 3.90, 2.24, 2.22, 2.19, 2.04, 2.01, 1.99, 1.97, 1.70, 1.67, 1.65, 1.61, 1.45, 1.42, 1.40, 1.37, 0.98, 0.95.

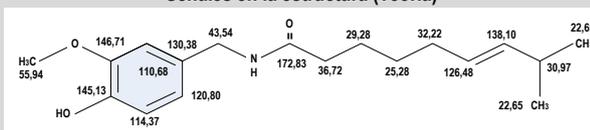
Señales de carbono: ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.83, 146.71, 145.13, 138.10, 130.38, 126.48, 120.80, 114.37, 110.68, 55.94, 43.54, 36.72, 32.22, 30.97, 29.28, 25.28, 22.65.

Tabla 3
Comparativo señales de carbono teoría y de análisis, e isómero trans de capsaicina

TEORÍA	DE ANÁLISIS
172,81	172,81
146,65	146,71
145,03	145,13
137,98	137,98
130,23	130,38
126,39	126,48
120,66	120,80
114,32	114,37
110,61	110,68
55,86	55,94
43,47	43,54
36,65	36,72
32,19	32,22
30,92	30,97
29,24	29,28
25,26	25,28
22,62	22,65



Señales en la estructura (Teoría)

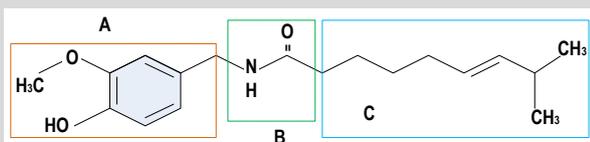


Señales en la estructura (De análisis)

Trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida (capsaicina)

La capsaicina estructuralmente se caracteriza por presentar en mayor proporción el isómero trans, porque en el isómero cis, el grupo -CH (CH₃)₂ y la cadena más larga en el otro lado del doble enlace estarán muy cerca, haciendo que se repelan levemente entre sí; este impedimento estérico no existe en el isómero trans. Esta tensión adicional impuesta hace que el isómero cis sea una disposición menos estable que el isómero trans. [4]

Estructuralmente se puede dividir la molécula de capsaicina en tres regiones: A (anillo aromático), con una especial importancia del grupo fenólico 4-OH; B (enlace amida) y C (cadena lateral hidrofóbica). [5]



Fuente: Resultados espectrograma RMN, elaboración propia sobre información de [4], [5]

CONCLUSIONES

El método convencional de maceración, ha establecido que en cuatro horas se obtiene un contenido significativo de capsaicina, sin mostrar una diferencia significativa a mayor tiempo de extracción. También, se puede afirmar que a menor tamaño de partícula existe un mejor rendimiento de extracción.

La interacción de presión y temperatura en la técnica de fluidos supercríticos presenta un efecto significativo para la obtención o extracción de capsaicina en las dos variedades de ají.

El análisis RMN, permitió comparar la estructura de la capsaicina obtenida, estableciendo una similitud importante con el isómero trans-8-metil-N-vainilil-6-noneamida).

BIBLIOGRAFÍA

Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., García, V. C., 2019, Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. Food Chemistry, USA,

Calle, C., Martínez, J. C., 2012, El Ají y El Maní: su contribución en la generación de ingresos en Padilla, Chuquisaca. Fund. PROINPA, Sucre-Bolivia,

Chavez, S. J., Cázares, S. E., Ramírez, V. P., Castillo, G. F., Soto, H. R., Rodríguez, G. M., 2005, Capsaicinoids and preference of use in different morph types of chili peppers (*Capsicum annum* L.) of east central Yucatán. Agrociencia, México,

Lopera, G., Montoya, R., Cardona, J., Peña, J., Gil, M., Ríos, L., Restrepo, G., 2006, Obtención de oleoresina de pimentón (*Capsicum annum* L.). Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Scielo-Colombia.

Referencias bibliográficas:

- [1] Mukhopadhyay, M., 2000, Natural extracts Using Supercritical Carbon Dioxide. New York: CRC Press LLC. USA,
- [2] Mendiola, J. A., Herrero, M., Castro P., M., Ibáñez, E., 2013, Supercritical Fluid Extraction. Madrid: RSC Green Chemistry N°. 21. Madrid-España,
- [3] Lopera, G., Montoya, R., Cardona, J., Peña, J., Gil, M., Ríos, L., Restrepo, G., 2006, Obtención de oleoresina de pimentón (*Capsicum annum* L.). Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Scielo-Colombia,
- [4] Villar Estrada, J. E., 2019, Capsaicinoides, compuestos fenólicos, actividad antioxidante in vitro y color de 100 accesiones de *Capsicum* spp. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú,
- [5] Reyes, E. M., Gonzalez, M. E. G., Vazquez T., E., 2011, Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. Molecules 16, USA.

Fe de autores:

(*): Licenciada en Química Industrial, Facultad de Tecnología-UMSA.

(**): Licenciada en Química Industrial, Docente, Facultad de Tecnología-UMSA.

(***): Magister en Ciencias Químicas Investigador Instituto de Investigaciones Químicas Facultad de Ciencias Puras y Naturales-UMSA.