



**CARACTERIZACIÓN DE TETRATERPENOS EN PASTA DE AJÍ HABANERO
(*CAPSICUM CHINENSE*)**

DANIELA NAAR CERÓN

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

SANTIAGO DE CALI

2018-1

**CARACTERIZACIÓN DE TETRATERPENOS EN PASTA DE AJÍ HABANERO
(*CAPSICUM CHINENSE*)**

DANIELA NAAR CERÓN

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA
FARMACÉUTICA**

TUTOR

GUILLERMO LEÓN MONTOYA, Ph.D

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

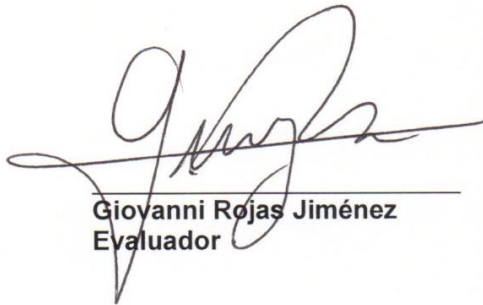
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

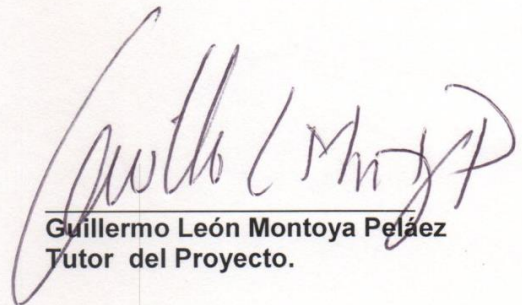
SANTIAGO DE CALI

2018-1



APROBADO POR:


Giovanni Rojas Jiménez
Evaluador


Guillermo León Montoya Peláez
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios y a la Virgen María por acompañarme durante esta etapa de vida, por nunca abandonarme, siempre ser mi luz y brindarme la fuerza necesaria para sobrepasar todos los obstáculos presentados de diferentes maneras. Gracias por permitirme conocer personas maravillosas que han llenado mi vida de felicidad y enseñanzas, personas valiosas que deseo me acompañen por toda la vida.

A mis padres y abuela por ser el motor de mi vida, ser los seres más comprensivos y amorosos, por brindarme su apoyo incondicional en lo que llevo de vida y en mi carrera y que estoy segura será así por siempre. Gracias por sus enseñanzas y porque por ustedes soy la persona que soy hoy en día. Este logro que estoy a punto de concluir es para ustedes, para que se sientan orgullosos de mí y para que sepan que por ustedes doy mi vida entera. Dios me dio el mejor regalo y fue ponerlos en mi vida. Los amo.

A la universidad Icesi por ser parte de este proceso no solo en el desarrollo académico sino personal. Al profesor Guillermo Montoya por enseñarme y fortalecerme como persona y futura profesional. A Diana por colaborar en el desarrollo de este proyecto y permitirme conocerla. También, a cada una de esas personas que de una manera u otra me ayudaron a concluir este logro y que no están presentes.

Gracias a Lau y Gaby por ser esas amigas que me han acompañado durante mi carrera y parte de mi vida, por su incondicionalidad y brindarme su amor y amistad, la cual anhelo que continúe latente por el resto de mi vida porque ustedes más que amigas son mis hermanas. Ustedes me han enseñado que la amistad verdadera existe y por nada del mundo las perdería.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL PROYECTO	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	14
2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	14
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE.....	15
2.2.1 <i>Capsicum spp.</i>	15
2.2.2 Los carotenoides	16
2.2.3 Estructura química y estabilidad de los carotenoides.....	17
2.2.4 Métodos de análisis para identificación de carotenoides provenientes de diferentes fuentes naturales.....	18
2.3 OBJETIVOS.....	20
2.3.1 Objetivo general.....	20
2.3.2 Objetivos específicos.....	20
2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA.....	21
2.4.1 Materiales	21
2.4.2 Recolección del fruto de ají habanero	21
2.4.3 Procesamiento del fruto ají habanero	23
2.4.4 Extracción de los carotenoides.....	23
2.4.5 Eliminación del solvente orgánico y concentración de los carotenoides 24	
2.4.6 Extracción en fase sólida.....	26
2.4.7 Cromatografía planar.....	27
2.4.8 Determinación de las condiciones cromatográficas.....	28
2.4.9 Análisis en el HPLC-PDA.....	29
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
2.5.1 Cromatografía planar.....	31
2.5.2 Análisis en el HPLC – PDA.....	32
2.5.2.1 Máximos de absorbancias de los carotenoides.....	34
2.5.2.2 Porcentaje de carotenoides libres y esterificados	44
2.6 CONCLUSIONES	46
2.7 RECOMENDACIONES.....	47
3. BIBLIOGRAFÍA.....	48

4. ANEXOS.....	51
Anexo 1. Resultados de los cromatogramas obtenidos por HPL-PDA para los diferentes estadios de ají habanero.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los carotenoides	17
Tabla 2. Cantidad de pasta (g) usada para realizar la extracción de cada estadio de maduración.....	23
Tabla 3. Cantidad de solvente (mL) usado para realizar la extracción de cada estadio de maduración.....	24
Tabla 4. Condiciones cromatográficas establecidas.	28
Tabla 5. Gradiente de corrida experimental.	29
Tabla 6. Carotenoides libres presentes en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.	37
Tabla 7. Carotenoides esterificados presentes en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.	38
Tabla 8. Carotenoides libres presentes en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.	40
Tabla 9. Carotenoides esterificados presentes en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.	40

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cromatogramas HPLC-PDA para cada estadio de maduración	32
Gráfica 2. Longitudes de onda de máxima absorción para carotenoides libres en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.....	35
Gráfica 3. Longitudes de onda de máxima absorción para carotenoides esterificados en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.	36
Gráfica 4. Longitud de onda de máxima absorción para el carotenoide libre en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.....	39
Gráfica 5. Longitud de onda máxima absorbancia para carotenoides esterificados en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.	39
Gráfica 6. Longitudes de onda de máxima absorbancia para la etapa de maduración U.S N° 1 mixto.....	41
Gráfica 7. Longitudes de onda de máxima absorbancia para la etapa de maduración U.S N° 1 verde.	41
Gráfica 8. Porcentaje de carotenoides libres y esterificados en la etapa de maduración U.S N° 1 anaranjado.....	44
Gráfica 9. Porcentaje de carotenoides libres y esterificados en la etapa de maduración U.S N° 1 rojo.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del isopreno.....	17
Figura 2. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 rojo.....	22
Figura 3. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 anaranjado.....	22
Figura 4. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 mixto.....	22
Figura 5. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 verde.....	23
Figura 6. Extracción para cada estadio de maduración. a) U.S N° 1 verde, b) U.S N° 1 mixto, c) U.S N° 1 anaranjado y d) U.S N° 1 rojo.....	24
Figura 7. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 rojo.....	25
Figura 8. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 anaranjado.....	25
Figura 9. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 mixto.....	25
Figura 10. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 verde.....	26
Figura 11. Montaje para la activación de los cartuchos en la extracción en fase sólida.....	26
Figura 12. Extracto de metanol (a) y acetona (b) para cada estadio de maduración.....	27
Figura 13. Cromatografía planar en hexano (6): acetato de etilo (4).....	28
Figura 14. Viales de cada muestra para inyección en el HPLC-PDA.....	30
Figura 15. Cromatografía de capa delgada para cada estadio de maduración. a) U.S N° 1 verde, b) U.S N° 1 mixto, c) U.S N° 1 anaranjado y d) U.S N° 1 rojo.	31
Figura 16. Muestras concentradas.....	32
Figura 17. Cromatograma modelo de carotenoides.....	33
Figura 18. Estructura química base de la clorofila.....	42
Figura 19. Estructura química de la feofitina.....	43
Figura 20. Estructura química de la clorofilida.....	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los cromatogramas obtenidos por HPL-PDA para los diferentes estadios de ají habanero	52
Anexo 2. Áreas bajo la curva totales para casa estadio de maduración.	52

RESUMEN DEL PROYECTO

Los carotenoides son componentes de una gran diversidad de alimentos, entre estos el ají, específicamente el género *Capsicum*, abarcando sus diferentes especies. Actualmente, se están desaprovechando múltiples funciones las cuales serían muy útiles para solventar problemáticas relacionadas con diversas enfermedades que afectan la salud, por tanto, el conocimiento de estas biomoléculas ha generado mayor interés en el área investigativa. Para solventar la problemática planteada, se propuso el análisis completo de la especie de ají *Capsicum chinense* (ají habanero) en 4 etapas de maduración (rojo ideal, rojo aceptable, intermedio y verde), por medio de la estandarización de un método analítico adecuado, que permitiera caracterizar los carotenoides presentes, utilizando los máximos de absorbancia como parámetro de identificación. La técnica analítica seleccionada fue HPLC- PDA (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con Arreglo de Fotodiodos), para la cual se buscó implementar las condiciones cromatográficas adecuadas que permitieran separar y detectar los componentes de interés, considerando la complejidad matricial con la que se contaba debido al origen vegetal de la muestra.

Se caracterizaron 12 tipos de carotenoides por medio de los máximos de absorción obtenidos para cada estadio de maduración del fruto. Además, se logró determinar que el estadio de maduración rojo ideal posee un mayor contenido de carotenoides en comparación con los estadios de maduración menores. Como resultado se obtuvo que en cuanto a los carotenoides libres, el ají habanero ideal presentaba menor contenido de estos compuestos con un porcentaje de 50,94% mientras que el rojo aceptable tuvo 30,62%, reconociendo que el estadio verde e intermedio contenían otros componentes como la feofitina y clorofila A, los cuales no hacen parte de los compuestos de interés. Por otro lado, al analizar los carotenoides esterificados se determinó que el estado de maduración rojo ideal presenta una composición mayor (49,06%), a diferencia del rojo aceptable (69,38%).

El desarrollo del proyecto buscó proveer una mayor información acerca de la composición del ají habanero, principalmente en cuanto al contenido de carotenoides presentes en dicho fruto. Lo anterior con el fin de aportar a futuros estudios y servir como base para evidenciar la importancia de este fruto y su alto grado de carotenoides contenidos, los cuales podrían solventar diferentes condiciones patológicas que afectan la salud de la sociedad.

Palabras clave: Carotenoides, Radicales libres, *Capsicum chinense*, HPLC-PDA, absorbancia máxima.

ABSTRACT

The carotenoids are components of a great diversity of foods, between these the chili pepper, specifically the *Capsicum* genre, encompassing their different species. Nowadays, the multiple functions of this, are being misused, which could be useful to solve problematics related with diverse diseases that affect health, so, the knowledge of these biomolecules has generated more interest in the investigation area. To solve the raised problematic, it has been proposed the complete analysis of the species of the chili pepper *Capsicum chinense* (habanero chili pepper) in four states of maturity (ideal red, acceptable red, intermediate and green), through the standardization of an adequate analytical method, which allowed to characterize the present carotenoids, using the maximum of absorbance as a parameter of identification. The analytical technique selected was HPLC-PDA (High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection), for which it was looked for the implementation of the adequate chromatographic conditions which allowed to separate and to detect the components of interest, considering the matrix complexity which was counted due to the vegetal origin of the sample.

Twelve types of carotenoids were characterized through the maximum absorbances obtained for each state of maturity of the fruit. Also, it was determined that the state of ideal red maturity possesses major quantity of carotenoids, in comparison with the states of less maturity. As a result, it was obtained that, about the free carotenoids, the ideal habanero chili pepper presents less quantity of this compounds with a percentage of 50,94% while the acceptable red had 30,62%, recognizing that the states green and intermediate contain other components as pheophytin and chlorophyllide (a), which are not part of the compounds of interest. As such, analyzing the specified carotenoids, it was determined that the state of maturity of ideal red presents a higher composition, with a percentage of 49,06%, different of the acceptable red, which was 69,38%.

The development of the project looked to provide more information about the composition of the habanero chili pepper, principally about the content of carotenoids present in this fruit. The above, with the purpose of contributing to future studies and to be used as a base to show the importance of this fruit and its high grade of carotenoids present on it, which could solve different pathological conditions that affects health.

Keywords: Carotenoids, Free radicals, *Capsicum chinense*, HPLC-PDA, maximum absorbance.

1. INTRODUCCIÓN

El interés por el conocimiento de las múltiples aplicaciones que pueden tener los carotenoides como compuestos activos, no solo a nivel industrial como pigmentos, sino también en el área de la salud, ha generado un mayor empeño por conocer su ubicación y estabilidad fisicoquímica en diversos organismos (vegetales y/o animales). En el último tiempo la atención se ha centrado en el fruto de ají *Capsicum spp.*, el cual ha demostrado tener un alto contenido de carotenoides, por lo cual es deseable conocer y caracterizar su composición. El estadio de maduración confiere diferentes colores al fruto, siendo rojo el más maduro y verde el menos maduro. Así mismo, este es un parámetro crítico que se relaciona de manera directamente proporcional con el contenido de carotenoides. (Rodríguez-Burruezo, González-Mas, & Nuez, 2010).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, cada color tiene asignado una especificación técnica en función de su forma. Los frutos de ají que presentan este parámetro “bastante bien definido”, reciben la denominación de U.S N° 1. Los estados de maduración de las muestras obtenidas para desarrollar el presente proyecto, presentaban colores específicos rojo, anaranjado y verde, además de un estado de maduración intermedio que mostraba una mezcla de los colores rojo y verde. Así, para cada uno de ellos la designación técnica es U.S N° 1 rojo, anaranjada, verde y mixto (combinación de color rojo-verde), según corresponda (*Point & Inspection, 2016*).

Los carotenoides son metabolitos que se caracterizan por desempeñar funciones esenciales y específicas en los organismos que tienen la capacidad de sintetizarlos, y en aquellos que aunque no puedan producirlos, los consuman (*Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016*). Además de ser los responsables de la coloración del fruto que los contiene, han generado mayor atracción en diferentes ramas de la ciencia debido a sus propiedades antioxidantes, lo que les permite ejercer un efecto protector en enfermedades como el cáncer o patologías oculares.

Dichos componentes se han identificado en este fruto por medio de la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada al Arreglo de Fotodiodos (HPLC-PDA), principalmente con el uso de una columna en fase reversa C-30, y fases móviles con diferentes proporciones de solventes polares y apolares (*Butnariu, 2016*). De esta manera se busca identificar moléculas conocidas y reportadas en el fruto, las cuales se caracterizan por presentar un carácter dual de polaridad, aunque predominando en la mayoría de los casos la apolaridad.

2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Los carotenoides han sido componentes de gran relevancia a nivel nacional e internacional, debido a las numerosas aplicaciones que se les atribuyen en el área investigativa de diferentes ramas de la ciencia, generando así un interés especial en el conocimiento de su localización, propiedades y funciones en los diferentes organismos que los contienen.

Estos componentes han demostrado proveer color a diferentes sistemas vegetales como plantas, verduras y frutas, además de algunos microorganismos que los sintetizan (*Rivera & Canela, Garayoa, 2012*); de ahí su uso principal como colorante, tanto en la industria cosmética como en la alimentaria. En la naturaleza existen cerca de 700 carotenoides, de los cuales aproximadamente 50 se encuentran relacionados con la formación de la vitamina A, lo que ha generado que el enfoque hacia estos compuestos deje de ser exclusivo para el marco culinario (condimentos de cocina y colorantes). Por consiguiente, se han ido reconociendo a nivel investigativo aplicaciones potenciales, como su poder protector contra diferentes enfermedades cardiovasculares, cáncer, y condiciones oculares relacionadas con la edad como las cataratas. Dichos beneficios se basan en las propiedades antioxidantes que presentan frente a radicales libres (*Himkus, Ushway, & Erkins, 2009*).

El estudio y análisis de este fruto de ají como materia prima en industrias como la cosmética y/o farmacéutica, ha tomado fuerza paulatinamente en diferentes áreas del conocimiento, tales como la biología, química, medicina, y la ecología. Simultáneamente a estos avances, se ha implementado el uso de diferentes técnicas y metodologías analíticas en esta área, las cuales pueden resultar adecuadas para obtener una completa identificación de los carotenoides.

Teniendo en cuenta el marco planteado anteriormente, el proyecto buscó proveer el desarrollo de una metodología analítica que permitiera caracterizar dichos componentes, impactando positivamente en la adquisición de nuevos conocimientos sobre de la composición de carotenoides en el fruto del ají habanero. De esta manera, se generará una gran contribución tanto en el ámbito comercial como en el industrial, valorizando el producto y expandiendo su mercado mediante el aprovechamiento de sus propiedades.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DE ARTE

2.2.1 *Capsicum spp.*

Capsicum spp. es una especie vegetal conocida ancestralmente por su cosecha y utilización en poblaciones de la India y América del centro y del sur. En la colonización española a América, esta planta fue tomada y llevada a continente europeo para ser posteriormente comercializada y distribuida en diferentes países y ciudades del mundo. Gracias a este recorrido histórico, el fruto ha sido útil para generar productos innovadores que han impactado en aspectos sociales, económicos, nutricionales y de salud, generando un mayor interés por parte de la población (Bridgemohan, Mohammed, & Bridgemohan, 2018).

El ají es una hortaliza que hace parte de la familia solanácea y pertenece al género *Capsicum*, dentro del cual es posible encontrar entre 20-30 especies diferentes (Solarte, Martín, & Orozco, 2013). Su origen proviene especialmente de países como Bolivia y Perú, ubicados en regiones tropicales y subtropicales de América. Actualmente, este fruto es altamente consumido a nivel nacional e internacional por sus atributos organolépticos y de alta pungencia, los cuales llaman la atención de la población. Además, se constituye de diversos compuestos como los carotenoides, las vitaminas C y E, alcaloides, flavonoides y capsaicinoides; cabe resaltar que los niveles de estos componentes fluctúan de especie a especie, dependiendo del genotipo, la etapa de maduración y las condiciones ambientales durante su crecimiento y pos-cosecha. Dichas variaciones han generado un mayor interés para la evaluación de cómo la proporción de cada componente influye en sus propiedades o características (Paulo, n.d.).

Colombia se ha caracterizado por ser un país en el que la producción de ají ha evolucionado de manera exponencial a través del tiempo, teniendo como resultante la fabricación de nuevos productos derivados de este fruto. Actualmente, las especies que más se producen son el tabasco, cayena, habanero y el jalapeño, este último en menor cantidad. Los principales departamentos productores de ají en Colombia corresponden al Valle del Cauca, Bolívar, Atlántico, Magdalena y la Guajira (Sánchez et al., 2008).

Dentro de las 20-30 especies pertenecientes a este género, se destacan principalmente cinco: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum pubescens* (Pino, Sauri-Duch, & Marbot, 2006). Según múltiples investigaciones, la especie *Capsicum chinense* (o “chile habanero” como se le conoce comúnmente) es reconocida como una de las especies con mayor grado de pungencia, debido a que posee un mayor contenido de capsaicina en su fruto. Sin embargo, su elevada comercialización no solo se debe a que imparte sabor picante a la comida, pues también presenta propiedades farmacológicas de gran interés para la industria farmacéutica (Borges, 2010).

2.2.2 Los carotenoides

Las plantas son los organismos que mayoritariamente componen la naturaleza. Estas a su vez se encuentran integradas por una gran variedad de componentes químicos que desempeñan múltiples funciones, por ejemplo los carotenoides, pigmentos que se relacionan con la absorción de energía solar y la coloración de las mismas. Por lo tanto, son de alta relevancia en procesos como la fotosíntesis y la fotoprotección (*Eldahshan, Nasser, & Singab, 2013*).

Los carotenoides proporcionan atractivos colores a las plantas, flores, frutas y verduras que los contienen, favoreciendo la polinización y dispersión de las semillas por otros animales (*Hornero, Méndez, Gómez, Ladrón De Guevara, & Mínguez, Mosquera, 2000*). Además, suministran precursores para la biosíntesis de fitohormonas, ácidos abscísicos (ABA) y estrigolactonas (SL), tales como los apocarotenoides. Como valor agregado, sus derivados actúan como moléculas de señalización al mediar el desarrollo de la planta y las respuestas que estas presentan ante estímulos externos o ambientales (*Sun et al., 2017*).

Sin embargo, su importancia no se limita a los organismos vegetales, pues sus funcionalidades pueden extrapolarse para el uso en seres humanos, quienes no poseen la capacidad de sintetizarlos. Ejemplos de sus aplicaciones son:

- Colorantes naturales fundamentales en la industria de alimentos, tiñendo diversos productos como carnes, cereales, hortalizas, alimentos procesados, entre otros (*Solarte et al., 2013*).
- Cumplen funciones fisiológicas tras su consumo o aplicación, por ejemplo, a nivel investigativo se ha demostrado que los carotenoides ejercen un papel protector en diversas enfermedades gracias a sus propiedades antioxidantes (*Kiokias et al., 2016*).
- Algunos carotenoides (específicamente el α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina) son precursores de la vitamina A e intervienen en la prevención de cegueras nocturnas y otras patologías relacionadas con su déficit (*Rodríguez-Burruezo et al., 2010*).

Como dato adicional, estudios recientes han demostrado que las microalgas (organismos con un rol fundamental en los ecosistemas) se han convertido en un foco de investigación relevante, pues corresponden a una fuente de producción de carotenoides y otras sustancias como ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, lípidos y proteínas (*Gong & Bassi, 2016*).

2.2.3 Estructura química y estabilidad de los carotenoides.

Los carotenoides son compuestos orgánicos liposolubles, en su mayoría terpenoides de 40 carbonos que tienen en su cadena de polieno, ocho unidades de isoprenoides como base (ver figura 1) (Eldahshan et al., 2013). La principal diferenciación entre estos, corresponde tanto al número de enlaces dobles conjugados, como a los grupos funcionales oxigenados que pueden presentar en la zona terminal de la estructura química, y que les confieren sus propiedades cromóforas (Sandmann, 2002). Los diferentes tipos de carotenoides pueden formarse a partir de reacciones de ciclación, esterificación, hidroxilación, epoxidación, hidrogenación, entre otras, dadas en la estructura base de tetraterpeno (Giuffrida et al., 2013).

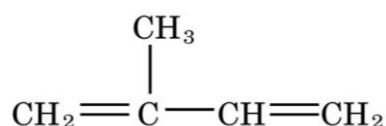
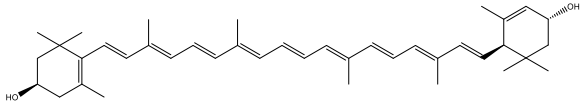
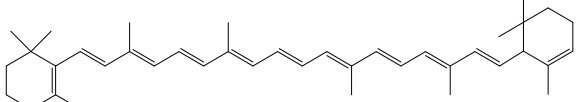
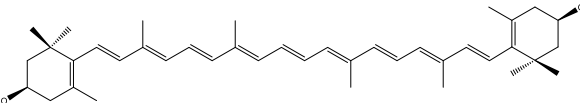
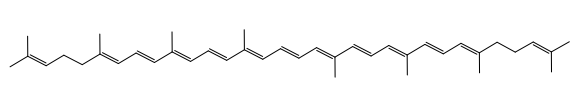


Figura 1. Estructura química del isopreno.

Se pueden clasificar en dos grupos principales: xantofilas y carotenos. Los primeros se caracterizan por tener átomos de oxígeno, por ejemplo en el caso de la luteína y la zeaxantina; por el contrario, en el segundo grupo no está presente dicho átomo (ver estructuras del α - caroteno y el licopeno) (Tabla 1) (Amorim, Carrilho et al., 2014).

Tabla 1. Clasificación de los carotenoides

Xantofilas	Carotenos
Luteína	α - caroteno
	
Zeaxantina	Licopeno
	

Con respecto a otro tipo de clasificación, los carotenoides se agrupan en dos familias isocromáticas: roja y amarilla. La roja abarca ciertos pigmentos característicos del género *capsicum*: capsantina, capsantinas -5,6-pepóxido y la capsorrubina. En cambio, en la familia amarilla es posible encontrar otro tipo de pigmentos como la zeaxantina, violaxantina, α -caroteno y α -criptoxantina entre otros (Hornero, Méndez et al., 2000). La variedad de colores en cada especie de *capsicum*, depende de la etapa de madurez en la que se encuentre el fruto, y así mismo de la capacidad que tenga para sintetizar carotenoides y retener pigmentos de clorofila (Collera, Zúñiga, García Jiménez, & Meléndez Gordillo, 2005).

Si bien las propiedades químicas discutidas anteriormente hacen que los carotenoides sean moléculas cromóforas responsables del color de los sistemas en los que se encuentran, estas mismas características los hacen susceptibles a procesos de degradación mediados por pH, calor, oxígeno y luz (Yahia & Ornelas-Paz, 2009). Por tal razón, se requiere protección frente a estos para evitar que se degraden y/o formen radicales libres (Collera, Zúñiga, García Jiménez, & Meléndez Gordillo et al., 2005).

2.2.4 Métodos de análisis para identificación de carotenoides provenientes de diferentes fuentes naturales.

Los carotenoides son compuestos solubles en solventes apolares, incluyendo aceites y grasas comestibles; por tal motivo, estos son los sistemas generalmente seleccionados en los procesos de extracción. Ejemplos corresponden a medios como el cloroformo, hexano, éter de petróleo y la acetona (Butnariu, 2016). Sin embargo, una consideración que debe realizarse es que estructuralmente algunos contienen grupos polares que atraen moléculas de agua presentes dentro del fruto; por tanto, para hacer su extracción se requieren solventes orgánicos con constantes dieléctricas no tan bajas, o realizar sistemas de mezcla de solventes con dicha característica. En general, la elección de este (o estos) se fundamenta en tres tópicos principales:

1. Propiedades fisicoquímicas del disolvente.
2. Naturaleza de los componentes de interés.
3. Afinidad del disolvente a las características del compuesto a extraer.

El método de extracción varía dependiendo del estado de agregación del compuesto bioactivo de interés, el cual puede ser sólido o líquido. Así pues, se puede realizar un proceso de extracción sólido-líquido o líquido-líquido (Butnariu, 2016).

Para el análisis e identificación de estos componentes, se ha encontrado que metodologías comunes como la cromatografía de gases y la espectroscopía infrarroja no son convenientes, debido a la termolabilidad y similitud de las

estructuras. En contraposición, técnicas como HPLC-PDA permiten obtener resultados espectrofotométricos que contribuyen a la obtención de los objetivos mencionados anteriormente, sin afectar la estabilidad de la muestra. Sin embargo, la semejanza estructural que presentan algunos de estos compuestos y la variedad de los mismos en la matriz de estudio, pueden dificultar la obtención de una alta resolución. Por este motivo, la instrumentación utilizada puede hacerse más apropiada y específica mediante el uso de LC-MS (Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas), proporcionando una mayor sensibilidad a la hora de detectar los componentes (*Schweiggert, Kammerer, Carle, & Schieber, 2005*).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

- Estandarizar una metodología analítica que permita la caracterización de los carotenoides presentes en la variedad de ají *Capsicum chinense*.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar las condiciones óptimas en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a Arreglo de Fotodiodos (HPLC-PDA) para la detección de carotenoides presentes en la especie de ají *Capsicum chinense*.
2. Identificar los máximos de absorbancia de los carotenoides presentes en la variedad de ají *Capsicum chinense* mediante la metodología de espectrofotometría UV acoplada a HPLC, para caracterizarlos cualitativamente.
3. Determinar de manera cuantitativa el porcentaje de carotenoides libres y esterificados contenidos en los diferentes estadios de maduración del ají *Capsicum chinense*, por medio de las áreas bajo la curva obtenidas en el HPLC-PDA.

2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1 Materiales

Los frutos de ají habanero fueron obtenidos de una cosecha en la empresa HUGO RESTREPO Y CIA S.A. Estos fueron procesados posteriormente. Los solventes orgánicos acetonitrilo, metanol y diclorometano fueron provistos en grados de análisis para HPLC por el almacén de laboratorios de la Universidad Icesi. Para el caso del solvente orgánico acetato de etilo, se adquirió de los solventes recuperados del laboratorio de investigación de fitoquímica. El agua purificada grado HPLC, se extrajo a partir de un sistema de purificación Arium pro Sartorius Stedim biotechnology VF, disponible en las instalaciones de la universidad.

2.4.2 Recolección del fruto de ají habanero

El día 8 de febrero del 2018 a las 8:35 am, se llevó a cabo el muestreo de los frutos en uno de los cultivos pertenecientes a la empresa HUGO RESTREPO Y CIA S.A. Se realizó con la ayuda del Ingeniero Agrónomo de la compañía, quien de manera voluntaria sirvió como colaborador principal guiando el proceso con base en el protocolo de recolección del fruto establecido por la institución.

Antes de comenzar la actividad, se realizó una reunión informativa por parte del ingeniero acerca de la relevancia del nivel de maduración o coloración, y la limpieza del fruto en la realización de la cosecha. En cuanto al primer aspecto, el nivel de coloración debe ser completo, ya que esta uniformidad en el fruto asegura que no habrá variación en las características del producto final. Con respecto al segundo factor, la limpieza debe ser total para evitar impurezas orgánicas como residuos de pedúnculo u hojas.

Los estadios de maduración seleccionados fueron cuatro, en orden descendente, de mayor a menor: U.S N° 1 rojo, anaranjado, mixto y verde, observándose desde la figura 2 hasta la figura 5 respectivamente. Los frutos se llevaron de inmediato al laboratorio de investigación de fitoquímica para continuar con el procedimiento experimental establecido.



Figura 2. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 rojo.



Figura 3. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 anaranjado.



Figura 4. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 mixto.



Figura 5. Ají habanero estado de maduración U.S N° 1 verde.

2.4.3 Procesamiento del fruto ají habanero

Para poder procesar el fruto, inicialmente se retiraron de él los residuos de pedúnculo y hojas. Posteriormente se limpiaron, separaron, y se adicionaron a la licuadora con todos sus componentes, entre ellos las semillas y la cáscara, procesándolos hasta obtener un licuado uniforme en cuanto a tamaño.

2.4.4 Extracción de los carotenoides

Con el fin de realizar la extracción de los carotenoides en cada estadio de maduración del fruto, se dispuso cada pasta de ají en un envase de vidrio claramente identificado y cubierto en papel aluminio para proteger de la luz. A cada uno de los cuatro recipientes se le adicionó una cantidad específica en gramos, observada en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de pasta (g) usada para realizar la extracción de cada estadio de maduración.

Estadio de maduración	Cantidad de pasta (g)
U.S N° 1 rojo	150,45
U.S N° 1 anaranjado	150,47
U.S N° 1 mixto	150,33
U.S N° 1 verde	150,44

Posteriormente, en cada envase se adicionó la cantidad necesaria en mL de acetato de etilo para realizar la extracción de los carotenoides como compuestos de interés,

medido con una probeta de 1000 mL. Los volúmenes adicionados a cada envase de vidrio se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cantidad de solvente (mL) usado para realizar la extracción de cada estadio de maduración.

Estadio de maduración	Cantidad de acetato de etilo (mL)
U.S N° 1 rojo	501,50
U.S N° 1 anaranjado	501,56
U.S N° 1 mixto	501,10
U.S N° 1 verde	501,46

Cabe resaltar que la extracción se realizó en una proporción 1:3, en donde 1 era de fruto y 3 de solvente. El proceso se llevó a cabo por un periodo de tiempo de 72 horas. En la figura 6, se observa cada estadio de maduración durante el proceso de extracción.

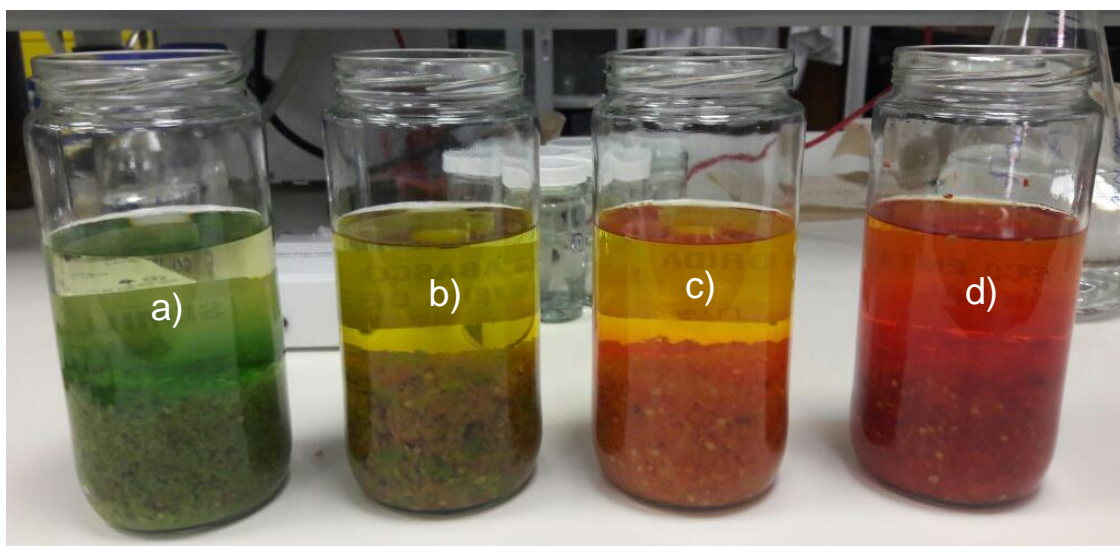


Figura 6. Extracción para cada estadio de maduración. a) U.S N° 1 verde, b) U.S N° 1 mixto, c) U.S N° 1 anaranjado y d) U.S N° 1 rojo.

2.4.5 Eliminación del solvente orgánico y concentración de los carotenoides

Con el fin de concentrar la muestra, estas se depositaron en balones y se colocaron en un rotaevaporador marca Heidolph con aplicación de vacío y temperatura (figuras 7 a 10). Se utilizó un vacío inicial de 240 mbar, seguido de disminuciones graduales

hasta concentrar la muestra. La temperatura aplicada fue de 40°C y la velocidad de rotación de 150 rpm.

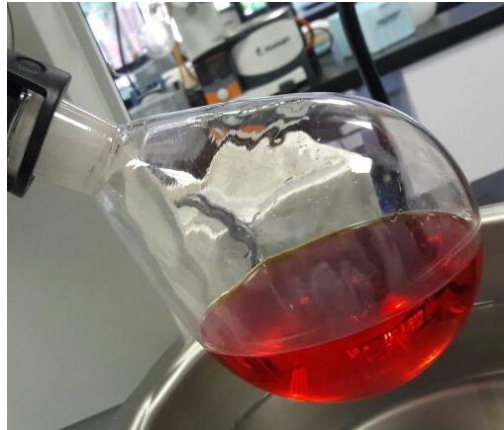


Figura 7. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 rojo



Figura 8. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 anaranjado



Figura 9. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 mixto.

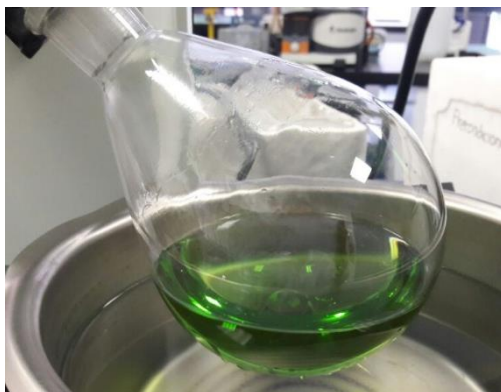


Figura 10. Rotaevaporación estadio U.S N° 1 verde

Con la ayuda de un embudo, cada muestra concentrada se dispuso en un tubo de vidrio recubierto en papel aluminio y claramente identificado.

2.4.6 Extracción en fase sólida

Con el fin de disminuir la complejidad de la matriz de estudio (generada por ser proveniente de un material vegetal integrado por componentes diferentes a los de interés), se procedió a realizar una extracción en fase sólida a cada muestra.

Se utilizó un colector de vacío Tecnokroma acoplado (de manera independiente) con cuatro cartuchos para cada extracto a analizar. Cada cartucho, previo a la elución del extracto, fue activado pasando una cantidad 2 mL de metanol y posteriormente 2 mL agua. Para cada solvente se encendió el sistema de vacío permitiendo que cada uno de éstos atravesara la columna y generaran así su activación. Ambos solventes fueron recolectados en un mismo tubo de ensayo como se observa en la figura 11, los cuales al terminar la activación se desecharon.

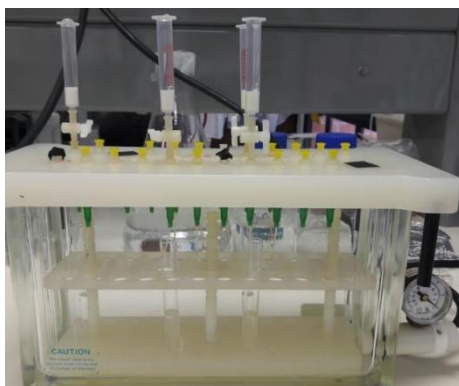


Figura 11. Montaje para la activación de los cartuchos en la extracción en fase sólida.

Con respecto al tratamiento de la muestra, se tomaron 50 μ L de cada extracto y por separado se depositaron en cada cartucho. A cada uno de éstos se le adicionó metanol y el sistema de vacío se encendió para que corriera el solvente. Después, se repitió el proceso con acetona. Cada uno de estos solventes se recolectó en un tubo de ensayo diferente como se observa en la figura 12. El ítem a) corresponde al extracto de metanol y el ítem b) al extracto de acetona.

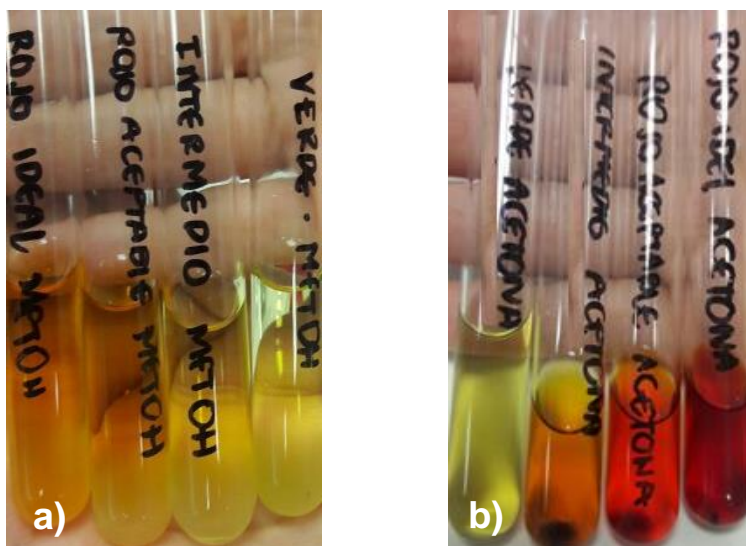


Figura 12. Extracto de metanol (a) y acetona (b) para cada estadio de maduración.

Los extractos obtenidos en acetona fueron los que se utilizaron para continuar con el procedimiento de preparación de muestra previa a la inyección en HPLC-PDA, debido a que los carotenoides son más afines por este solvente, teniendo en cuenta la polaridad del mismo. Lo anterior se confirma con la coloración observada en la figura 12. Como dicho solvente se caracteriza por ser muy volátil, los tubos de ensayo se cubrieron con papel aluminio y se dejaron un día con el fin de que el solvente se evaporara, obteniendo una muestra concentrada para cada estadio de maduración.

2.4.7 Cromatografía planar

Con cada muestra obtenida, se hizo una elución de la muestra en cromatografía de capa delgada con el fin de confirmar la presencia de carotenoides y la ausencia de agua. La placa de sílice (SiO_2) tenía una medida de 10 cm x 10 cm y se dividió equitativamente para disponer cada muestra; éstas se corrieron con un sistema de solventes adecuados que permitieran la separación de los carotenoides en función de sus estructuras químicas (mayoritariamente apolar, pero con grupos funcionales oxigenados que confieren cierto grado de polaridad). Dicho sistema correspondió a hexano (6): acetato de etilo (4).

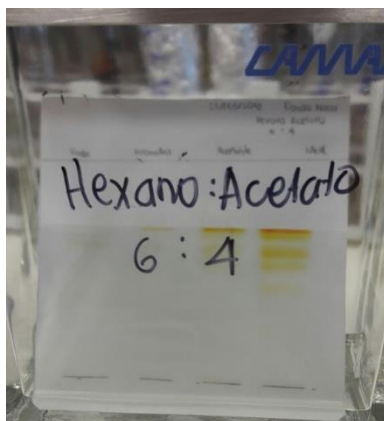


Figura 13. Cromatografía planar en hexano (6): acetato de etilo (4).

2.4.8 Determinación de las condiciones cromatográficas

Mediante la revisión de diferentes fuentes bibliográficas, fue posible reconocer e identificar las condiciones cromatográficas más empleadas para analizar carotenoides. Así, se seleccionaron las más óptimas según la disponibilidad de material en el laboratorio. Posteriormente se estudió de manera crítica la polaridad de los solventes a seleccionar, para así establecer la proporción adecuada de cada uno de ellos dentro de la fase móvil. Considerando que la columna a utilizar era una LaChrome Develosil C-30 en fase reversa, se determinaron la presión máxima y la tasa de flujo que se podían usar con el fin de no presurizarla.

Teóricamente, los carotenoides presentan picos de absorción de luz a los 470 nm (*Bijttebier et al., 2014*), pero para realizar un análisis más completo se realizó un barrido de UV-Vis entre 300 y 600 nm.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas establecidas.

Parámetro	Resultado
Fase móvil A (%)	Acetonitrilo: Agua (80:20 v/v)
Fase móvil B (%)	Metanol: Diclorometano (60:40 v/v)
Tasa de flujo (mL/min)	0,4
Presión (psi)	2171 – 2900
Volumen de inyección (µL)	10
Columna	Fase reversa C-30
Longitud de onda UV-Vis (nm)	300-600

De manera experimental, se determinó el gradiente de corrida teniendo en cuenta parámetros fundamentales como el tiempo y la proporción de ambas fases móviles. El mejor resultado obtenido que permitió la separación adecuada de los carotenoides se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de corrida experimental.

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	70	30
10	60	40
15	50	50
20	45	55
30	40	60
45	35	65
55	30	70
65	20	80
70	10	90
85	5,0	95
90	1,0	99
95	1,0	99
100	40	60
110	70	30

2.4.9 Análisis en el HPLC-PDA.

El sistema cromatográfico usado fue LaChrome Develosil 3 μm RP-Aqueous, el cual tiene una columna en fase reversa C-30 con dimensiones de 150 x 2 mm y un tamaño de poro de 140 Å . Este sistema se acopló al equipo HPLC-PDA disponible en el laboratorio de investigación de la Universidad Icesi, junto con las fases móviles a utilizar. Después, se dejó acondicionar la columna, dejando pasar las fases móviles con el equipo en estado off-line por un tiempo de 30 minutos.

Al tener el equipo adecuado con las condiciones establecidas, las muestras se dispusieron en viales color ámbar (como se observa en la figura 14) para su posterior inyección en el equipo; estas muestras se disolvieron en 2 mL de la fase móvil B y se pasaron por un filtro con tamaño de poro de 0,22 μm .



Figura 14. Viales de cada muestra para inyección en el HPLC-PDA.

Todo el procesamiento de los datos y análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa EZChrom Elite Versión 3.3 (2010), en el cual se ajustaron tanto las condiciones cromatográficas como el gradiente de corrida establecidos previamente a nivel experimental.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Cromatografía planar

El objetivo de la determinación de agua es que si la muestra presenta contenido de este solvente, los resultados obtenidos por HPLC-PDA se verán afectados. La presencia de agua en las muestras se mide mediante el aspecto de las bandas, confirmada por la distorsión de las mismas (ver zona señalada en la figura 15). Esta podría ser una potencial causa de error en los experimentos a realizar.

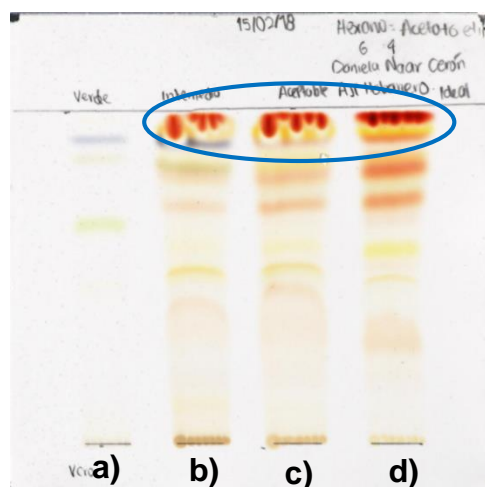


Figura 15. Cromatografía de capa delgada para cada estadio de maduración. a) U.S N° 1 verde, b) U.S N° 1 mixto, c) U.S N° 1 anaranjado y d) U.S N° 1 rojo.

Como valor agregado a esta prueba, se pudo corroborar la presencia de carotenoides por medio de una separación notoria de las bandas al final de la placa, pero sin saber con exactitud a cuál correspondía cada una. En las muestras b), c) y d) se presentan prácticamente las mismas bandas, pero variando en su intensidad de color.

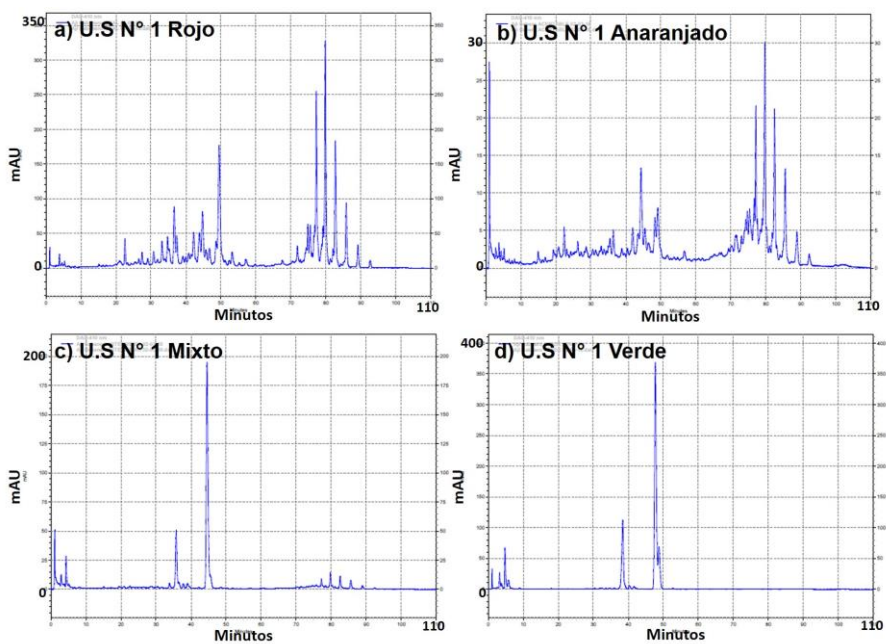
También se verificó que la muestra a) U.S N° 1 verde, no se encontraba bien concentrada. Por tal motivo, se tuvo como conclusión que las muestras debían volverse a rotaevaporar para concentrarlas más y eliminar el agua disponible. El resultado se expone en la figura 16.



Figura 16. Muestras concentradas

2.5.2 Análisis en el HPLC – PDA

La elución de cada una de las muestras tuvo una duración de 110 minutos, para un tiempo total de 440 minutos (o 7,3 horas). Los cromatogramas obtenidos se enseñan en la gráfica 1 para cada uno de los estadios de maduración.



Gráfica 1. Cromatogramas HPLC-PDA para cada estadio de maduración

Como se mencionó anteriormente, el análisis de los datos para cada muestra se hizo por medio de las áreas obtenidas, los respectivos tiempos de retención y sus máximos de absorbancia. Estos resultados se observan en el Anexo 4.1. Todos los picos obtenidos en las gráficas 1a) y 1b) se atribuyen a los carotenoides, ya que en estos no se detectaron picos de clorofila, contrario a las gráficas 1c) y 1d) en las que si se detectaron, como se explicará más adelante.

Teniendo en cuenta la polaridad en la que eluyen los componentes, la primera zona de los cromatogramas obtenidos corresponde a los carotenoides con presencia de grupos polares (carotenoides libres o xantofilas), mientras que la segunda zona pertenece a los carotenoides esterificados con ácidos grasos, que pueden ser mono o di esterificado (ver figura 17), y que por lo tanto son más apolares. Para este caso es importante reconocer que la reacción de esterificación de estos componentes no afecta su estructura principal de polieno, por lo cual no genera un efecto en el máximo de absorbancia del espectro de absorción. La esterificación se da principalmente con grupos laureato, miristato y palmitato (*Bijttebier et al., 2014*).

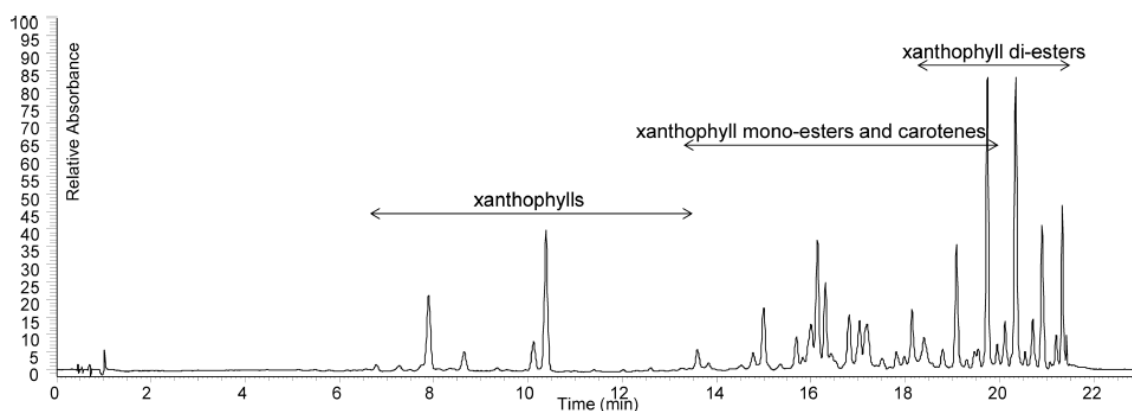


Figura 17. Cromatograma modelo de carotenoides.

La columna utilizada se caracterizaba por ser apolar con la sílice modificada con grupos hidrocarbonados C-30; por otra parte, se empleó un sistema de solventes donde la fase A mayoritariamente era polar y la fase B por el contrario tenía carácter apolar. Teniendo en cuenta estas consideraciones y el gradiente de corrida establecido, se puede explicar porque en los cuatro cromatogramas los carotenoides que primero eluyeron fueron los que tenían en su estructura grupos polares (carotenoides libres). Esto se debe a que hasta el minuto 45, la proporción de fase móvil A era mayor que la fase móvil B, y los compuestos que presentaban estructuralmente grupos polares eluyeron primero, al tiempo que los compuestos apolares quedaban retenidos en la fase estacionaria. En contraste, a partir del minuto 55 las proporciones de solventes se invirtieron, siendo mayor la fase móvil B que promovió la elución de los compuestos apolares retenidos por la fase estacionaria, que se visualizan a partir del minuto 70.

2.5.2.1 Máximos de absorbancias de los carotenoides

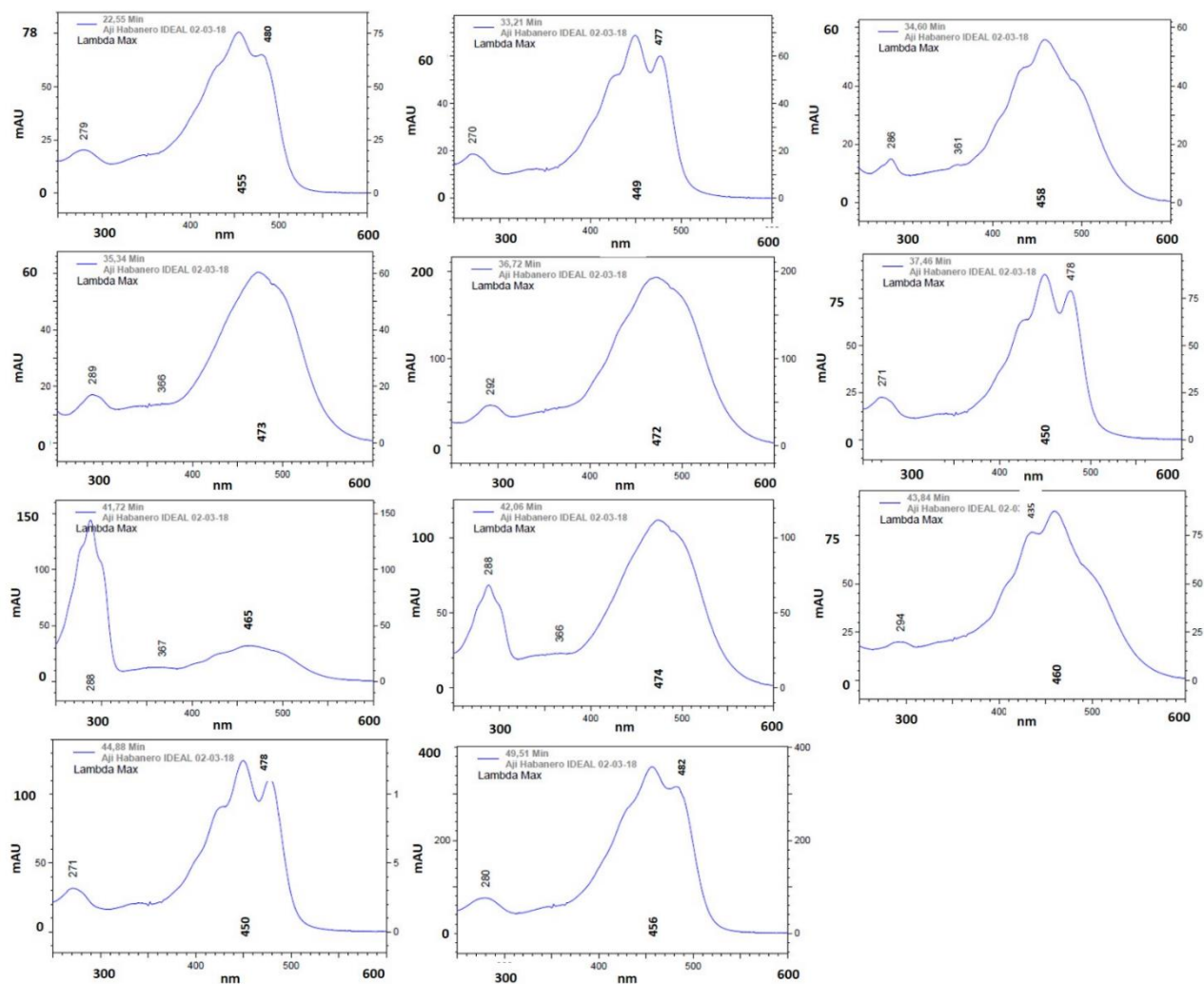
Teóricamente, una longitud de onda de 470 nm es muy específica para medir la absorbancia máxima de los carotenoides. Esta se encuentra comprendida dentro del rango establecido para el análisis experimental (300 a 600 nm).

Resulta importante considerar que la absorbancia máxima para cada carotenoide posiblemente se vea alterada según el sistema de fases móviles o condiciones cromatográficas utilizadas. Además, los carotenoides con isómeros cis se pueden identificar por medio de un tipo de desplazamiento hipsocrómico (longitud de onda más corta) (*Bijttebier et al., 2014*).

Para cada muestra, según los tiempos de retención, se enseñan los máximos de absorbancia en las siguientes secciones. Cabe resaltar que los valores experimentales de los máximos de absorción fueron comparados con los valores reportados en la literatura (*Bijttebier et al., 2014*), (*Giuffrida et al., 2013*), (*Schweiggert, Kammerer, Carle, & Schieber, 2005*).

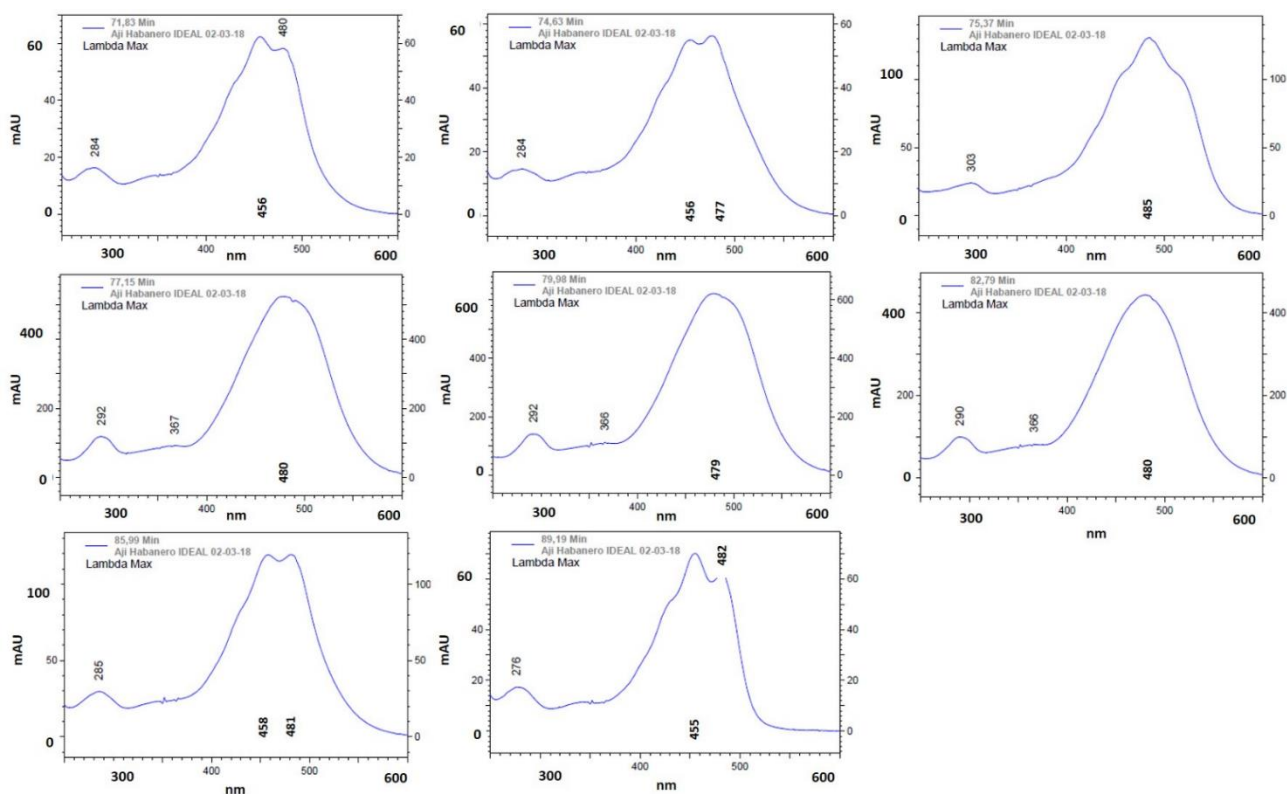
2.5.2.1.1 Análisis de la muestra U.S N° 1 rojo.

En la gráfica 2, se presentan las longitudes de onda de máxima absorción para los carotenoides libres (con tiempo de retención entre 22,6 y 49,5 minutos).



Gráfica 2. Longitudes de onda de máxima absorción para carotenoides libres en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.

Por su parte, en la gráfica 3 se enseñan las longitudes de onda de máxima absorción para los carotenoides esterificados con diferentes ácidos grasos.



Gráfica 3. Longitudes de onda de máxima absorción para carotenoides esterificados en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.

Una vez obtenidos estos datos experimentales, estos se relacionan con los datos presentes en la literatura mediante la tabla 6 para carotenoides libres, y la tabla 7 para carotenoides esterificados.

En la tabla 6, se presenta un carotenoide que según investigaciones realizadas (*Bijttebier et al., 2014*) no se encuentra identificado, aun cuando se obtiene su máximo de absorbancia. Sin embargo, es posible inferir de su fórmula molecular la evidencia átomos de oxígeno en su estructura, teniendo en cuenta su elución en la primera zona del cromatograma.

Tabla 6. Carotenoides libres presentes en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.

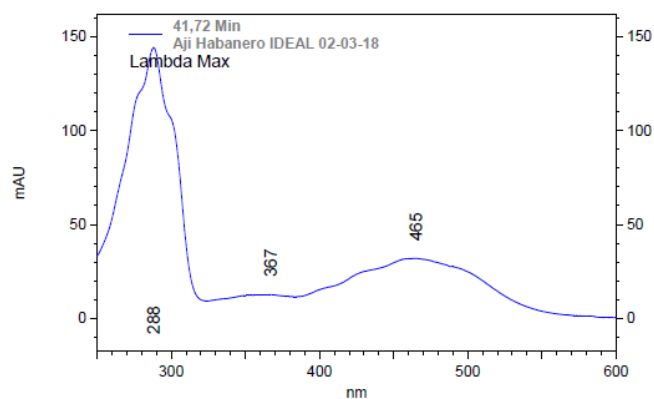
Etapa de maduración U.S N°1 rojo				
Carotenoides libres				
Nombre	Fórmula molecular	Tiempo de retención	Valor reportado en la literatura	Valor real
All-trans-Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	22,560	455,481	455,480
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	33,210	451,478	449,477
Cis-Capsantina	C ₄₀ H ₅₆	34,760	467	458
Criptocapsina	-	35,253	473	473
Astaxantina	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	36,720	470	472
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	37,460	451,478	450,478
Cis-Capsantina	C ₄₀ H ₅₆	41,420	467	465
Capsantina	C ₄₀ H ₅₆	42,060	474	472
-	C ₅₂ H ₈₈ O ₄	43,840	434,456	434,456
Zeaxantina	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	44,880	451,478	450,478
β- Criptoxantina	-	49,510	456,483	456,482

Tabla 7. Carotenoides esterificados presentes en la etapa de maduración U.S N°1 rojo.

Etapa de maduración U.S N°1 rojo				
Carotenoides esterificados				
Nombre	Fórmula molecular	Tiempo de retención	Valor reportado en la literatura	Valor real
All-trans-Zeaxantina-laurato (C12:0)	C ₃₂ H ₇₈ O ₃	71,830	455,483	456,480
All-trans-Zeaxantina-miristato (C14:0)	C ₄₀ H ₈₂ O ₃	74,820	455,479	456,477
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	75,370	479	485
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	77,150	479	480
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	79,980	479	479
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	82,790	479	480
β-Criptoxantina-palmitato (C16:0)	C ₅₆ H ₈₆ O ₂	85,99	457,482	458,481
All-tras-zeaxantina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₃	89,19	455,483	455,482

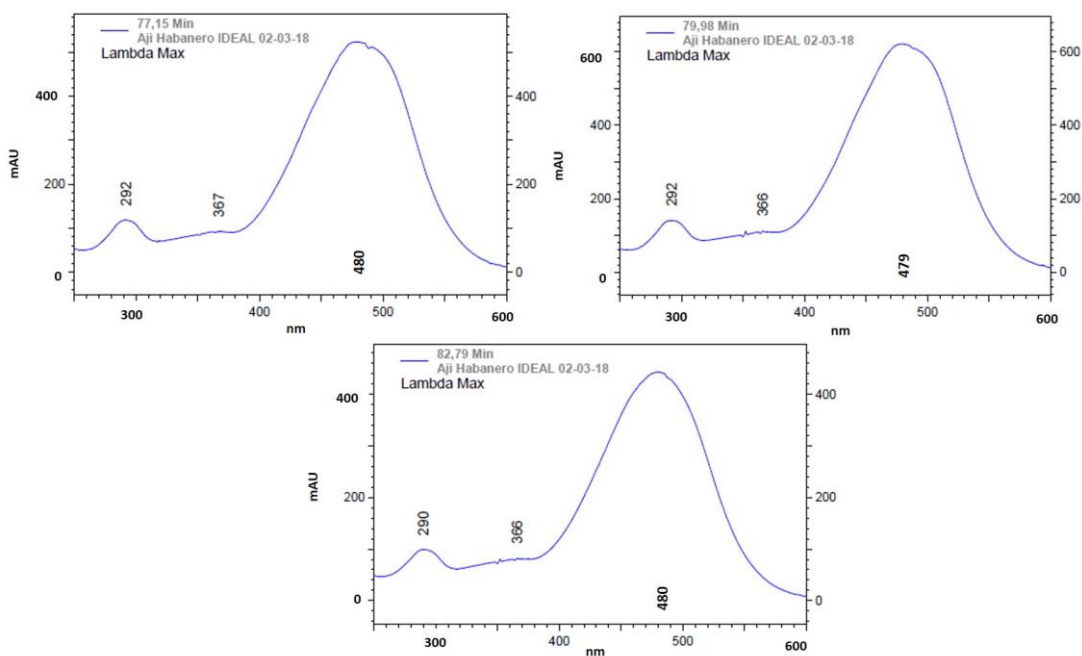
2.5.2.1.2 Análisis de la muestra U.S N°1 anaranjado

Para este estadio de maduración, se encontró un solo carotenoide libre:



Gráfica 4. Longitud de onda de máxima absorción para el carotenoide libre en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.

En la gráfica 5 se visualizan las longitudes de onda de máxima absorción para los carotenoides esterificados en esta muestra.



Gráfica 5. Longitud de onda máxima absorción para carotenoides esterificados en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.

En la Tablas 8 y 9 se enseñan tanto el carotenoides libre como los esterificados presentes en la muestra de ají habanero U.S N°1 anaranjado, respectivamente.

Tabla 8. Carotenoides libres presentes en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.

Etapa de maduración U.S N°1 anaranjado				
Carotenoides libres				
Nombre	Fórmula molecular	Tiempo de retención	Valor reportado en la literatura	Valor real
Cis-Capsantina	C ₄₀ H ₅₆	41,72	467	465

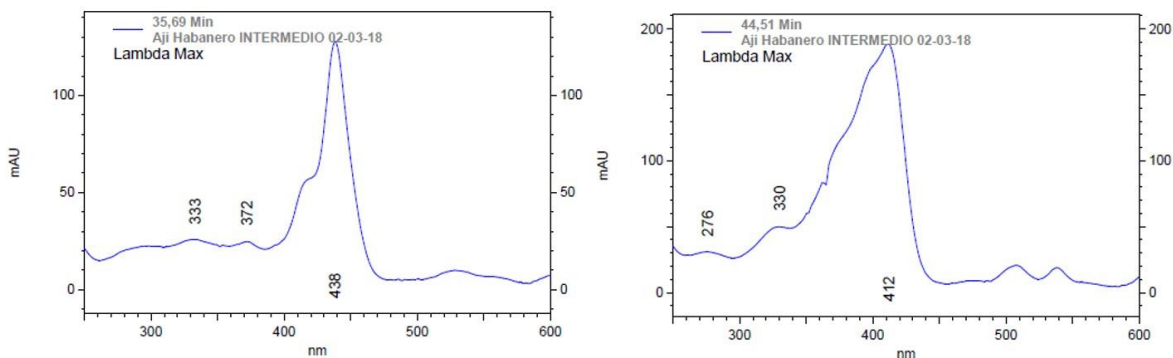
Tabla 9. Carotenoides esterificados presentes en la etapa de maduración U.S N°1 anaranjado.

Etapa de maduración U.S N°1 anaranjado				
Carotenoides esterificados				
Nombre	Fórmula molecular	Tiempo de retención	Valor reportado en la literatura	Valor real
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	77,150	479	480
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	79,667	479	479
Capsorrubina-laurato (C12:0)	C ₅₂ H ₇₈ O ₅	82,569	479	480

En este caso, se puede confirmar la presencia del mismo carotenoide esterificado según la comparación de valores reportados en la literatura y experimentales obtenidos.

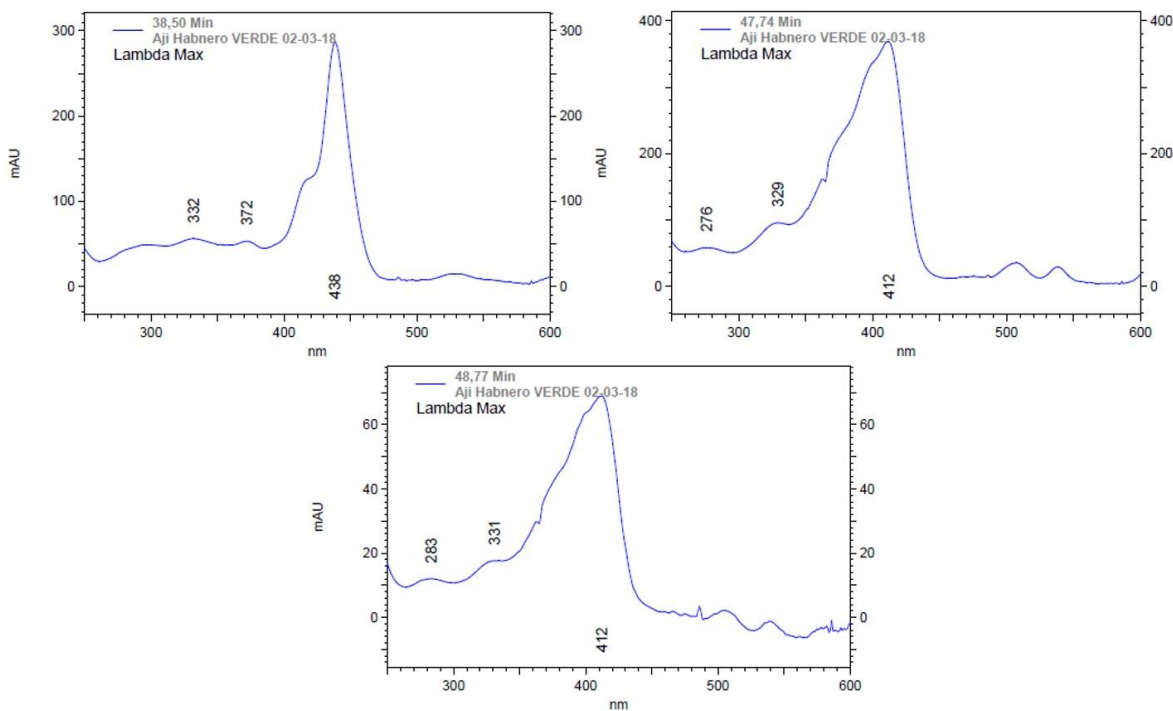
2.5.2.1.3 Análisis del ají habanero U.S N° 1 mixto y U.S N° 1 verde

A continuación, se observan las longitudes de onda a las cuales se obtuvieron valores máximos de absorbancia para la etapa de maduración de ají habanero U.S N° 1 mixto.



Gráfica 6. Longitudes de onda de máxima absorbancia para la etapa de maduración U.S N° 1 mixto.

Para la etapa de maduración U.S N° 1 verde, en la gráfica 7 están sus longitudes de onda de máxima absorbancia encontradas experimentalmente.



Gráfica 7. Longitudes de onda de máxima absorbancia para la etapa de maduración U.S N° 1 verde.

Como se mencionó anteriormente, la absorbancia máxima de los carotenoides suele aparecer en una longitud de onda de 470 nm, lo que conduce a la conclusión de que las longitudes de ondas observadas en las gráficas 6 y 7 (438 nm y 412 nm respectivamente), no se relacionan con la presencia de los mismos. Según la literatura (Milenković, Zvezdanović, Andelković, & Marković, 2012), estas absorbancias son características de compuestos orgánicos pertenecientes al grupo de las clorofilas (estructura base presentada en la figura 18), quienes al igual que los carotenoides son pigmentos capaces de absorber la energía lumínica y transformarla en energía química. Bajo este contexto, investigaciones anteriores han identificado a los derivados de estos compuestos por medio de técnicas espectrofotométricas similares a las realizadas durante el desarrollo del presente proyecto.

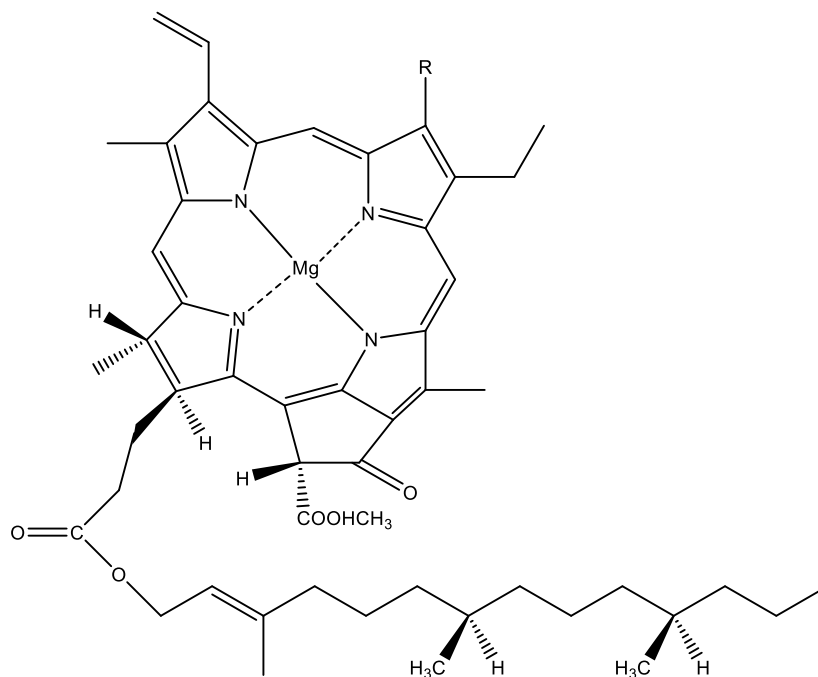


Figura 18. Estructura química base de la clorofila.

Este pigmento se subdivide en clorofila a y clorofila b, las cual se diferencian por su sustituyente "R" (CH₃ y CHO respectivamente). Se encuentran en algas fotosintéticas y plantas superiores. Además, este pigmento presenta varios derivados como las feofitinas (Pheo) y clorofilidas A y B, quienes se encuentran en reacciones fotosintéticas de plantas superiores y en tejido senescente o materia fecal del zooplancton (Grimm, Porra, Rüdiger, & Scheer, 2006).

En cuanto a los espectros de absorción de estos componentes, se tiene que la clorofila A presenta dos bandas de absorción en el rango visible, características asociadas a la deslocalización π que se encuentra en el borde del esqueleto del tetrapirrol cíclico.

Teóricamente (Milenković et al., 2012), la feofitina presenta una absorción máxima a una longitud de onda de 409,5 nm, de manera muy similar a las moléculas encontradas experimentalmente, las cuales arrojaron una absorción máxima en 412 nm. Por su lado, la banda de máxima absorción de la clorofilida A se encuentra en un valor cercano de longitud de onda de 440 nm en solventes orgánicos; experimentalmente, se obtuvo una banda de 438 nm, confirmando también la presencia de estos pigmentos. Sus estructuras químicas se exponen a continuación.

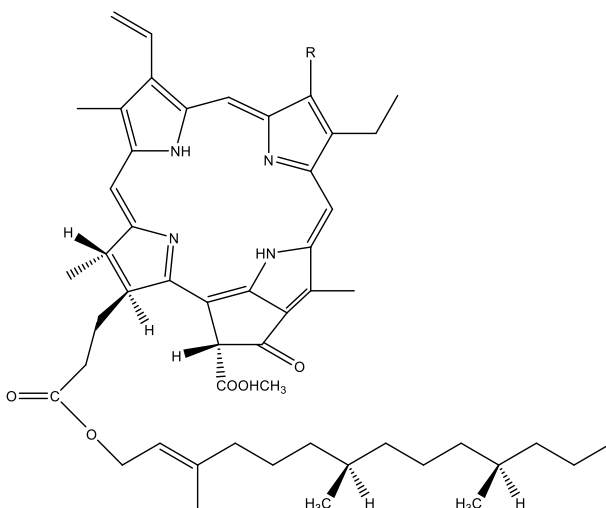


Figura 19. Estructura química de la feofitina,

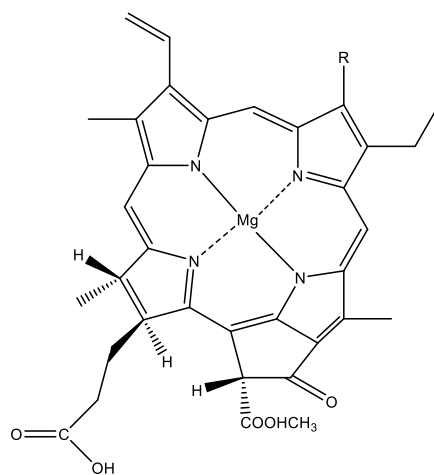


Figura 20. Estructura química de la clorofilida.

Para ambas etapas de maduración, los pigmentos derivados de la clorofila se encuentran en la primera zona de los cromatogramas obtenidos por HPLC-PDA, debido a que presentan grupos funcionales con cierta polaridad, especialmente en el caso de la clorofilida A que se encuentra esterificado y eluye antes en los cromatogramas.

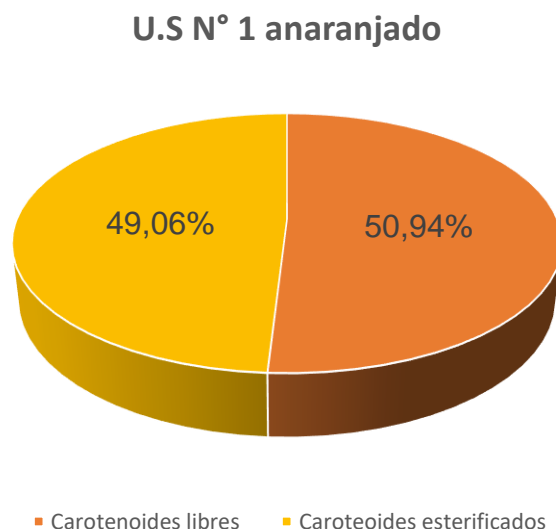
2.5.2.2 Porcentaje de carotenoides libres y esterificados

A medida que el fruto de ají habanero va atravesando por el proceso fisiológico de maduración, los carotenoides pertenecientes al grupo de las xantofilas llevan a cabo reacciones químicas de esterificación con ácidos grasos. Así pues, entre menos maduro el fruto, mayor contenido de carotenoides libres, pero al llegar a la maduración total, se consigue un equilibrio entre estas dos especies. Este proceso de reacción demuestra cómo se da el cambio de cloroplastos a cromoplastos (Schweiggert *et al.*, 2005).

Para conocer el contenido de carotenoides libres y esterificados, se recurrió al área bajo la curva correspondiente a cada uno de los carotenoides obtenidos a nivel experimental y el área bajo la curva total para cada etapa de maduración. Con ayuda de la ecuación (1) se determinó el porcentaje de carotenoides contenidos. Cabe resaltar que esta ecuación se utilizó solo para las etapas de maduración U.S N° 1 rojo y U.S N° 1 anaranjado, pues las dos restantes no presentaron especies relacionadas a este tipo de pigmentos.

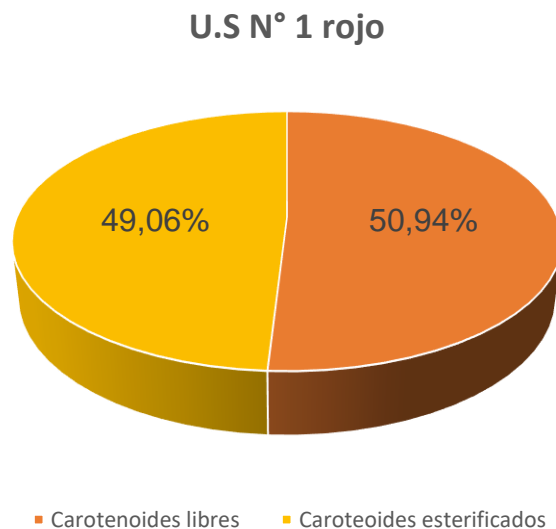
$$\% \text{ carotenoides} = \left(\frac{\text{área bajo la curva específico}}{\text{área bajo la curva total}} \right) \times 100 \quad (1)$$

En la gráfica 8, se muestra que para la etapa N° 1 anaranjado, se tiene mayor cantidad de carotenoides esterificados.



Gráfica 8. Porcentaje de carotenoides libres y esterificados en la etapa de maduración U.S N° 1 anaranjado.

Por otro lado, resultados presentados en la gráfica 9, comparan el grado de carotenoides libres y esterificados presentes en la etapa de maduración U.S N° 1 rojo. Aquí, se confirma el equilibrio entre ambas especies, como se discutió anteriormente, en función del avance en la maduración del fruto.



Gráfica 9. Porcentaje de carotenoides libres y esterificados en la etapa de maduración U.S N° 1 rojo.

La razón por la cual el tiempo de maduración es directamente proporcional al contenido de carotenoides libres, puede explicarse mediante reacciones de hidrólisis por la exposición más prolongada del fruto a factores como la humedad y la temperatura, que pueden catalizar dicho proceso, además del mayor tiempo de cosecha al que han permanecido.

2.6 CONCLUSIONES

Se extrajeron y caracterizaron 12 compuestos de carotenoides en el fruto de ají habanero por medio de la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada al Arreglo de Fotodiodos, obteniendo en los cromatogramas resultantes la diferencia marcada en la ubicación de dos diferentes grupos de carotenoides, correspondientes a los carotenoides libres y los carotenoides esterificados. Dicha diferencia se fundamentó en la variación de los grupos funcionales integrados en su estructura base, y por ende su polaridad. La elución de ambos grupos se controló mediante el gradiente de dos fases móviles que diferían en polaridad entre sí mismas.

Mediante los valores de absorbancia máxima y tiempo de retención de cada uno de ellos, se logró hacer una caracterización cualitativa de los diferentes tipos de carotenoides y otros pigmentos presentes en los frutos, en función de la etapa de maduración. Así, se determinó que las etapas U.S N°1 mixto y U.S N°1 verde no presentaban carotenoides, sino derivados de la clorofila, tales como feofitinas y clorofilidas.

Con los resultados de áreas bajo la curva para las etapas de maduración U.S N°1 rojo y U.S N°1 anaranjado, se encontró que el porcentaje de carotenoides libres aumenta conforme avanza la maduración del fruto. Lo anterior podría deberse a reacciones de hidrólisis mediadas por una mayor exposición a factores ambientales que promueven dichos procesos.

2.7 RECOMENDACIONES

En primera instancia, se recomienda que para el proceso de extracción de los carotenoides se utilice alcohol etílico como solvente, ya que este ha demostrado la obtención de un mayor rendimiento para cada carotenoide, a comparación del acetato de etilo (*Butnariu, 2016*). Lo anterior puede deberse a la diferencia en los momentos dipolares de ambos solventes (1,69 D y 1,88 D respectivamente), siendo más conveniente un sistema más apolar.

Se recomienda variar los solventes utilizados en las fases móviles para realizar la corrida en el HPLC-PDA, ya que se han obtenido mejores resultados con el metilterbutiléter (MTBE) como solvente de mayor proporción en la fase móvil B (apolar).

Por último, con el fin de obtener una caracterización más completa de los carotenoides esterificados, se recomienda utilizar la técnica analítica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS). Lo anterior porque la fragmentaciones de los grupos funcionales aportarían información para adquirir una identificación más certera.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *56*, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>
- Bijttebier, S., Zhani, K., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S., & Voorspoels, S. (2014). Generic characterization of apolar metabolites in red chili peppers (*Capsicum frutescens* L.) by orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(20), 4812–4831. <https://doi.org/10.1021/jf500285g>
- Borges, L., Cárdenas, L. C., Novelo, J. R., Fregoso, M. S., Reyes, V., & Villanueva, E. (2010). Capsaicinoids in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Under Various Humidity and Nutritional Conditions. *Terra Latinoamericana*, *28*(1), 35–41.
- Bridgemohan, P., Mohammed, M., & Bridgemohan, R. S. H. (2018). *Capsicums* (Vol. II). Trinidad and Tobago.
- Butnariu, M. (2016). Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *Journal of Ecosystem & Ecography*, *6*(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000193>
- Collera-Zúñiga, O., García Jiménez, F., & Meléndez Gordillo, R. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annum* L. *Food Chemistry*, *90*(1–2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.032>
- Eldahshan, O. A., Nasser, A., & Singab, B. (2013). Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8192*(1), 2668735–5. Retrieved from www.phytojournal.com
- Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C., & Dugo, G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*, *140*(4), 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.060>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, *34*(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Grimm, B., Porra, R., Rüdiger, W., & Scheer, H. (2006). Chlorophyll catabolites and the Biochemistry of chlorophyll Breakdown, 237–260. Retrieved from <https://www.springer.com/la/book/9781402045158>
- Himkus, J. O. E. L. S., Ushway, R. O. B., & Erkins, B. R. P. (2009). Determination of

Capsinoids by HPLC-DAD in Capsicum Species, 3452–3457.
<https://doi.org/10.1021/jf8040287>

Hornero-Méndez, D., Gómez-Ladrón De Guevara, R., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3857–64.
<https://doi.org/10.1021/jf991020r>

Kiokias, S., Proestos, C., & Varzakas, T. (2016). A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 4(1), 25–37. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.03>

Milenković, S. M., Zvezdanović, J. B., Anđelković, T. D., & Marković, D. Z. (2012). The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, 1(1), 16–24. Retrieved from <http://alfa.tf.ni.ac.rs/casopis/sveska1/c2.pdf>

Paulo, S. (n.d.). *Peppers: Capsaicinoids Content and Antioxidant Activity*. Sao Paulo, Brazil. <https://doi.org/doi:10.1002/jfsa.8459>

Pino, J., Sauri-Duch, E., & Marbot, R. (2006). Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chemistry*, 94(3), 394–398.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.040>

Point, S., & Inspection, M. (2016). Peppers Shipping Point and Market Inspection, (March).

Rivera, S. M., & Canela-Garayoa, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*, 1224, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.025>

Rodríguez-Burruezo, A., González-Mas, M. del C., & Nuez, F. (2010). Carotenoid Composition and Vitamin A Value in Ají (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 Pepper Species from the Andean Region. *Journal of Food Science*, 75(8), S446–S453. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01795.x>

Sánchez, G. (2008). *Análisis de agro negocios de alianza productiva y comercial de ají*. Cauca. Retrieved from <http://www.misionrural.net/observatorio/alianzas/productos/aji/7muni-valle/preinversion.pdf>

Sandmann, G. (2002). Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: A powerful approach for the biosynthesis of novel structures.

ChemBioChem, 3(7), 629–635. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<629::AID-CBIC629>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<629::AID-CBIC629>3.0.CO;2-5)

- Schweiggert, U., Kammerer, D. R., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(18), 2617–2628. <https://doi.org/10.1002/rcm.2104>
- Solarte, C., Martín, J., & Orozco, M. (2013). Extracción y evaluación de la calidad de pigmento del fruto del ají (*Capsicum frutescens*), como colorante natural en la industria alimenticia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 4. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., & Li, L. (2017). Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids Tianhu. *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>
- Yahia, E. M., & Ornelas-Paz, J. de J. (2009). Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*, 1, 177–222. <https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch7>

4. ANEXOS

HABANERO U.S N° 1 rojo					
CAROTENOIDES LIBRES			CAROTENOIDES ESTERIFICADOS		
TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA	TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	%ÀREA
22,560	4534772	0,870	71,860	2432274	0,470
33,153	4776316	0,920	74,820	7369946	1,410
34,760	3042958	0,580	75,327	10589969	2,030
35,253	1895063	0,360	77,253	76590732	14,700
36,633	18335690	3,520	79,820	108754251	20,870
37,407	5186457	1,000	82,700	44720455	8,580
41,720	7403046	1,420	85,800	18618379	3,570
42,187	5658430	1,090	89,147	4635635	0,890
43,780	6978852	1,340		273711641	
44,720	14232333	2,730			
49,480	48739344	9,350			
	120783261				
HABANERO U.S N° 1 aceptable					
CAROTENOIDES LIBRES			CAROTENOIDES ESTERIFICADOS		
TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA	TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA
41,460	9900324	6,170	77,107	2595565	1,620
			79,667	4205185	2,620
			82,460	2735907	1,710
				9536657	
HABANERO U.S N° 1 mixto					
CAROTENOIDES LIBRES			CAROTENOIDES ESTERIFICADOS		
TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA	TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA
35,773	13333575	4,18			
44,567	22688604	7,11			
	36022179				
HABANERO U.S N° 1 verde					
CAROTENOIDES LIBRES			CAROTENOIDES ESTERIFICADOS		
TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA	TIEMPO DE RETENCION	ÀREA	% ÀREA
38,4130	42610496	13,52			
47,7270	52017924	16,51			
48,7600	9414391	2,99			
	104042811				

Anexo 1. Resultados de los cromatogramas obtenidos por HPL-PDA para los diferentes estadios de ají habanero

Estadio de maduración				
	Rojo Ideal	Rojo Aceptable	Intermedio	Verde
Área total	394494902	19436981	36022179	104042811

Anexo 2. Áreas bajo la curva totales para cada estadio de maduración.