

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“Extracción y cuantificación de Capsaicina de siete variedades de
Capsicum pubescens “Rocoto” nativas de Arequipa.”**

Tesis presentada por la Bachiller:
Ana Carolina Perochena Escalante
Para obtener el título Profesional de
Ingeniero Biotecnólogo
Asesor: José Villanueva Salas, PhD.

AREQUIPA- PERU

2015

INDICE

CAPITULO I: GENERALIDADES.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Hipótesis.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Variables de estudio.....	4
1.4.1 Variables Independientes.....	4
1.4.2 Variables Dependientes.....	4
1.4 Justificación.....	5
CAPITULO II: MARCO TEORICO.....	6
2.1 Género <i>Capsicum</i>	6
2.2 Descripción botánica del genero <i>Capsicum</i>	7
2.2.1 Características morfológicas del género <i>Capsicum</i>	7
2.2.2 Características de la flor.....	7
2.2.3 Características del fruto.....	8
2.3 Rocoto.....	10
2.3.1 Taxonomía.....	11
2.3.2 Condiciones de cultivo del rocoto.....	12
2.3.3 Producción nacional por regiones.....	13
2.3.4 Composición química del rocoto.....	13
2.3.5 Usos tradicionales del rocoto.....	15

A. Protector estomacal.....	16
B. Desinflamante y antibiótico.....	17
C. Productor de endorfinas.....	17
D. Tratamiento de Hipertensión.....	17
E. Fuente de vitamina C.....	17
2.4 Capsaicina.....	17
2.4.1 Características.....	19
2.4.2 Distribución y Función vegetal.....	19
2.4.3 Síntesis.....	21
2.4.5 Aplicaciones y usos de Capsaicina.....	24
A. Efectos en la salud.....	24
B. Antioxidantes.....	26
C. Obesidad.....	26
D. Analgésico tópico contra el dolor.	27
E. Actividad anti-microbiana.	27
F. Antiinflamatorio.....	28
G. Autodefensa.....	28
H. Otras aplicaciones.....	29
2.5 Cromatografía.....	30
2.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	31
2.6 Extracción asistida por ultrasonido.....	32
2.7 Perspectivas futuras.....	39
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1 Campo de Investigación.....	40
3.1.1 Ámbito Geográfico.....	40
3.1.2 Estrategia de recolección de datos.....	40

3.1.3 Unidades de Estudio.....	40
3.2 Materiales.....	41
3.2.1 Material vegetal.....	41
3.2.2 Reactivos Químicos.....	41
3.2.3 Material de vidrio.....	41
3.2.4 Material convencional.....	42
3.2.5 Equipos.....	42
3.3 Metodos.....	44
3.3.1 Recolección de la muestra.....	43
A. Condiciones de siembra.....	43
B. Identificación y caracterización de la especie vegetal. Componentes de estudio IPGRI	44
3.3.2 Método de extracción.....	50
A. Preparación de las Muestras.....	50
B. Extracción de Capsaicina.....	51
C. Determinación de parámetros de extracción.....	51
3.3.3 HPLC.....	51
3.3.3.1 Desarrollo patrones cromatográficos.....	51
A. Preparación de Solución Stock.....	51
B. Preparación de Estándares.....	51
C. Preparación de fase móvil y desgasificación.....	52
D. Preparación de equipo HPLC.....	52
E. Operaciones de inicio del equipo de HPLC.	53
F. Determinación de longitud de onda.....	54
G. Estandarización del método.....	54
3.3.4 Cuantificación de Muestras.....	55

3.3.5 Métodos estadísticos.....	55
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
4.1 Desarrollo de métodos.....	56
4.1.1 Recolección de la muestra.....	56
A. Condiciones de siembra.....	56
B. Identificación y caracterización de la especie vegetal.....	58
C. Componentes de estudio IPGRI.....	59
4.1.2 Método de extracción.....	65
A. Preparación de las Muestras.....	65
B. Extracción de Capsaicina.....	65
C. Determinación de parámetros de extracción.....	68
4.1.3 HPLC.....	68
4.1.3.1 Desarrollo patrones cromatográficos.....	68
A. Preparación de Solución Stock.....	68
B. Preparación de Estándares.....	69
C. Preparación de fase móvil y desgasificación.....	69
D. Determinación de longitud de onda.....	69
E. Estandarización del método.....	70
F. Curva de calibración.....	71
G. Linealidad.....	73
H. Sensibilidad.....	75
I. Precisión.....	76
4.1.4 Cuantificación de Muestras.....	78
4.1.5 Análisis de Resultados.....	86
4.1.6 Discusiones.....	90
CONCLUSIONES.....	93
RECOMENDACIONES.....	94

REFERENCIAS.....	95
BIBLIOGRAFIA ONLINE.....	109
ANEXOS.....	110



INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Variables independientes.....	4
Tabla N°2. Variables dependientes.....	4
Tabla N°3. Nombres comunes de diferentes variedades de especies domesticadas del género <i>Capsicum</i>.....	9
Tabla N°4. Información general del rocoto, <i>Capsicum pubescens</i>.	10
Tabla N°5. Taxonomía de <i>Capsicum pubescens</i>.	12
Tabla N°6. Producción nacional.	13
Tabla N°7. Compuestos atribuidos al rocoto.	14
Tabla N°8. Composición de la hortaliza en datos de análisis dietéticos practicados por el Departamento de Nutrición del Perú en 1978.	15
Tabla N° 9. Aplicaciones del ultrasonido.....	35
Tabla N° 10. Diferentes solventes empleados para la extracción de Capsaicina.....	38
Tabla N° 11. Datos de localización de la estación experimental INIA.....	40
Tabla N° 12. Datos de calidad de solventes y patrón.....	41
Tabla N° 13. Características De Suelo.....	58
Tabla N° 14. Codificación de las muestras recolectadas.....	59
Tabla N° 15. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de parte vegetativa.....	60
Tabla N° 16. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de semillas.....	60
Tabla N° 17. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de datos de la planta.....	61

Tabla N° 18. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de datos de Inflorescencia.....	62
Tabla N° 19. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para fruto.	63
Tabla N° 20. Parámetros evaluados en las pruebas piloto a diferentes condiciones.....	66
Tabla N° 21. Parámetros finales establecidos para el método de extracción.	67
Tabla N° 22. Concentración de estándares.....	69
Tabla N° 23. Condiciones del Método.....	71
Tabla N° 24. Datos para la curva de calibración de Capsaicina.....	71
Tabla N° 25. Descripción de los datos cuantitativos.....	72
Tabla N° 26: determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión.....	74
Tabla N° 27. Análisis de varianza para la determinación de la linealidad.....	75
Tabla N° 28. Valores para la determinación de la sensibilidad.....	76
Tabla N° 29. Valores para la determinación de la precisión.....	77
Tabla N° 30. Valores del análisis estadístico.....	77
Tabla N° 31. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad A.....	79
Tabla N° 32. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad B.....	80
Tabla N° 33. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad C.....	81
Tabla N° 34. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad D.....	82
Tabla N° 35. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad E.....	83
Tabla N° 36. Datos de cada corrida cromatográfica de la accesión F.....	84
Tabla N° 37. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad G.....	85
Tabla N° 38. Datos promedio del análisis mediante HPLC.....	86

Tabla N° 39. Datos finales de la concentración de Capsaicina en cada variedad de rocoto.....	87
Tabla N° 40. Tabla de parámetros importantes de las muestras de rocoto. Variedades A, B y C.....	110
Tabla N° 41. Tabla de parámetros importantes de las muestras de rocoto. Variedades D, E, F y G.....	111
Tabla N° 42. Tabla de distribución T.....	121
Tabla N° 43. Tabla de valores críticos de f para test de una cola ($p=0.05$).....	122



INDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Diversidad de frutos del género <i>Capsicum</i>.	7
Figura N°2. Características de flor y fruto para diferentes especies del genero <i>Capsicum</i>.....	8
Figura N°3. Descriptor de <i>Capsicum pubescens</i>.....	11
Figura N°4. Salsa de rocoto.....	16
Figura N°5. Rocoto relleno.....	16
Figura N°6. Molécula de Capsaicina.....	18
Figura N°7. Molécula de Dihidrocapsaicina.....	18
Figura N°8. Molécula de Capsaicina en modelamiento 3D de la Capsaicina.....	19
Figura N°9: Ondas Sonoras.....	33
Figura N°10: Rangos de sonidos.....	34
Figura N°11. Representación Gráfica de la toma de muestras de Instituto de Innovación Agraria INIA, Estación Experimental de Santa Rita.....	44
Figura N°12. Esquema de equipo de filtración.....	53
Figura N°13. Vista satelital del Instituto de Innovación Agraria INIA, Estación Experimental de Santa Rita, Arequipa.....	57
Figura N°14. Vista de planta y flor del cultivo de rocoto de la Estación Experimental e Santa Rita de Siguanayacu.....	42
Figura N°15. Vista del Equipo de extracción asistida por ultrasonido, con muestras de rocoto.....	68
Figura N°16. Del barrido espectral de patrón de Capsaicina en software del equipo de HPLC.....	70
Figura N° 17. Grafica de la calibración en función a su desviación estándar.....	72
Figura N° 18. Grafica de calibración de Capsaicina.....	73

Figura N°19. Vista integral del equipo de HPLC.....78

Figura N°20. Vista de viales con muestras de cada variedad de *Capsicum pubescens*.....78

Figura N° 21.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm promedio entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad A.....79

Figura N° 22.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad B.....80

Figura N° 23.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad C.....81

Figura N° 24.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad D.....82

Figura N° 25.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad E.....83

Figura N° 26.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad F.....84

Figura N° 27.Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad G.....85

Figura N° 28. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para las 7 diferentes variedades de rocoto.....88

Figura N° 29. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de pulpa para las 7 diferentes variedades de rocoto.....89

Figura N° 30. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas para las 7 diferentes variedades de rocoto.....89

Figura N°31. Vista de las muestras de rocoto embolsadas en bolsas herméticas y pesadas de rocoto entero.....	114
Figura N°32. Pesadas de rocoto entero).....	114
Figura N°33. Patrón de Capsaicina (Sigma-Aldrich).....	114
Figura N°34. Esquema de equipo de filtración de solventes .Vista de filtro de membrana para la filtración de solvente y vista del filtro después de la filtración.....	114
Figura N°35. Vista de homogenización de muestra de pulpa.....	114
Figura N°36. Vista de algunas muestras antes de la extracción asistida por ultrasonido.....	114
Figura N°37. Vista de extracción asistida por ultrasonido.....	115
Figura N°38. Filtros de jeringa de 0.45 µm estériles Macherey-Nagel.....	115
Figura N°39. Vista de algunas muestras de pulpa y semillas posteriores a la extracción asistida por ultrasonido.....	116
Figura N°40. Vista del filtrado de muestras con filtro de jeringa y disposición de muestra en viales.....	116
Figura N°40. Vía del equipo de HPLC y muestras de extracto de rocoto.....	117
Figura N°41. Vista de los solventes integrados al equipo de HPLC.....	117
Figura N°42. Vista general de equipo de HPLC.....	117
Figura N°43. Columna cromatográfica integrada al horno del equipo de HPLC, empleada para la determinación y cuantificación de Capsaicina.....	118
Figura N°44. Viales de algunas muestras de extractos de rocoto tanto para muestras de pulpa o semillas a ser analizados por HPLC.....	118
Figura N°45. Vista del de una muestra representativa del análisis de Capsaicina.....	121
Figura N°46. Vista de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G.....	122

Figura N°47. Vista tipo Max plot de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G.....	123
Figura N°48. Vista tipo ratio plot de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G.....	124
Figura N°49. Vista de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G con trazo añadido.....	125
Figura N°50. Vista de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina.....	126
Figura N°51. Vista tipo ratio plot de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina.....	127
Figura N°52. Vista tipo 3D del barrido espectral del patrón de Capsaicina.....	128
Figura N°53. Vista tipo 3D del barrido espectral del patrón de Capsaicina y absorción de barrido espectral.	129
Figura N°54. Vista de absorción del barrido espectral de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina (280 nm).....	130

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sobre todas las cosas, por regalarme vida y bendiciones.

A mis padres Eduardo y Anita, ambos ejemplos de vida; por su amor, ejemplo, confianza, valores, sabios consejos y apoyo incondicional.

A mi hermano Eduardo por siempre darme lecciones de vida, por su apoyo y cariño.

A Miguel Paz Beltrán, por todo su amor, comprensión y su apoyo total siempre.

A mi asesor, PhD. José Villanueva Salas por su tiempo, orientación, sugerencias y consejos.

A la Universidad Católica Santa María. En especial al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica y maestros de esta facultad apoyando a mi formación académica.

A los miembros del Laboratorio de Control de Calidad , Ricardo Abril y Kukuli Medina, quienes me apoyaron con gran amabilidad y cariño , brindando sus conocimientos y apoyo.

A mis jurados, por su amabilidad, buena disposición, paciencia y por el tiempo que dedicaron para que este trabajo culminara exitosamente.

A mis amigos, por mostrar el significado de la verdadera amistad, mostrando su apoyo y cariño siempre.

Eternamente agradecida

Ana Carolina Perochena Escalante

ABREVIATURAS

a: Intercepto de la regresión lineal simple

Abs: Absorbancia

ANOVA: Análisis de varianza

b: Ordenada al origen

M: Molaridad

N: Normalidad

Ppm: Partes por millón

Isocrático: Término utilizado en cromatografía para designar un disolvente o mezcla de disolventes que se utiliza a lo largo de la misma, a diferencia de la cromatografía con gradientes de disolventes.

IPGRI: *International Plant Genetic Resources Institute*. Instituto Internacional de recursos genéticos en Plantas

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*. Cromatografía Líquida de Alta Performance

CAS: El registro CAS abarca sustancias identificadas por la literatura científica desde 1957 al presente con algunas clases principales hasta los inicios de los años 1900's. Cada sustancia en este registro se identifica por un Identificador Numérico Único llamado Número CAS de Registro.



RESUMEN

Un problema en el Perú, a pesar de ser un país muy rico en recursos naturales, es la falta de información sobre los componentes y principios activos de las diversas plantas medicinales, tal y como es en el caso del “Rocoto”, *Capsicum pubescens*; el cual a pesar de ser ampliamente usado en la comida peruana y medicina tradicional no es explotado a nivel industrial por falta de información sobre sus bondades.

Es por esto que se trata de un gran interés científico el investigar los componentes bioactivos en el rocoto y la cuantificación de los mismos, en especial de la Capsaicina. En el presente trabajo se determinó la concentración promedio de Capsaicina en 7 variedades diferentes de rocoto, *Capsicum pubescens* provenientes de las zonas productoras de la Región de Arequipa (dichas muestras fueron proporcionadas gracias al Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA). Las muestras se recolectaron por conveniencia en un cultivar específico, donde las condiciones de riego y suelo fueron estandarizadas. Posteriormente se realizó la identificación de la especie vegetal y diferentes características con el descriptor *IPGRI* para *Capsicum* spp. La extracción de Capsaicina se realizó mediante

extracción asistida por ultrasonido donde se compararon parámetros como son la relación muestra-solvente, solvente de extracción, temperatura y tiempo de extracción. El tratamiento con 10 mL de metanol como solvente extractivo por cada 1 g de muestra, en relación 1:10, durante 20 minutos a una temperatura de 25 C° demostró tener las mejores condiciones de extracción, basados en la cuantificación de Capsaicina mediante *HPLC*. Para la determinación y cuantificación de Capsaicina esta se realizó mediante cromatografía líquida de alta performance – *HPLC*, usando como fase móvil 68% metanol 32% agua, con un flujo de 1 mL/min, utilizando una columna cromatográfica RP-18(5 µm) a una temperatura de 45°C. Los cromatogramas obtenidos permitieron identificar y cuantificar la cantidad de Capsaicina de las diferentes 7 variedades de rocoto y se demostró que los rocotos de la variedad G, correspondiente al código de variedad PER007109, poseen la mayor concentración de Capsaicina. En conclusión se logró extraer y cuantificar Capsaicina de siete variedades de *Capsicum pubescens* “Rocoto” nativas de Arequipa.

Palabras clave: Cromatografía, Capsaicina, *Capsicum pubescens* HPLC, INIA, IPGRI

ABSTRACT

A problem in Peru, despite being very rich country in natural resources, is the lack of information about the active compounds and active principles of medicinal plants, as is the case of “Rocoto”, *Capsicum pubescens*; which despite being widely used in Peruvian food and traditional medicine is not industrially exploited for lack of information about its potential.

This is why it is a great scientific interest to investigate the bioactive components in it and quantification of them, especially capsaicin. In this study it was analyzed the average concentration of capsaicin in 7 different varieties of rocoto, *Capsicum pubescens* from native areas in the region of Arequipa (these samples were provided through the National Institute of Agrarian Innovation INIA). Samples were collected for convenience in a specific cultivar, where irrigation and soil conditions were standardized. Subsequently the identification of the species and different characteristics with IPGRI descriptor for *Capsicum* spp was performed. For the Capsaicin extraction, it was performed using ultrasound assisted extraction where it was compared solvent parameters such as sample-solvent ratio, extraction temperature and extraction time. Treatment for extraction with 10 mL of methanol as solvent per 1 g of sample, 1:10 for 20 minutes at a temperature of 25 °C proved to be the best extraction conditions based on the quantification of Capsaicin by HPLC. For the determination and quantification of capsaicin this was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) using as mobile phase 68% methanol 32% water, with a flow of 1 mL / min, using a chromatographic column RP-18 (5 microns) with a temperature of 45°C. The chromatograms obtained allowed to identify and quantify the amount of capsaicin of seven different varieties rocotos, showing that the variety G, corresponding to the code of variety PER007109, have the highest concentration of capsaicin. In conclusion it is possible to extract and quantify capsaicin from seven accessions from *Capsicum pubescens* “Rocoto” from Arequipa.

Keywords: Chromatography, Capsaicin, *Capsicum pubescens* HPLC, INIA, IPGRI

INTRODUCCION

Actualmente la Capsaicina en otros países es una sustancia muy ponderada en el mercado farmacéutico, se le atribuyen características anti cancerígenas, uso medicinal tópico como analgésico y es un aditivo biodegradable en pigmentos y pinturas, a las cuales les provee un carácter repelente.

La flora peruana constituye una de las mayores reservas de recursos naturales del mundo. El consumo de rocoto y otros ajíes en el Perú se remonta a épocas muy antiguas. Sin embargo no se han realizado análisis para poder determinar si el picor de un rocoto, es decir el contenido de Capsaicina tiene una relación directa a sus variedades.

La necesidad de dicho estudio llevó al desarrollo de un método de extracción de capsaicinoides en rocotos nativos de la localidad de Arequipa empleando la extracción asistida por ultrasonido. Durante el desarrollo de un método de extracción asistido por ultrasonidos se deben evaluar diferentes disolventes de extracción, temperaturas, tiempos de extracción, volumen de disolvente, cantidad de muestra, así como la repetitividad y reproducibilidad del método. El método se ha desarrollado evaluando el contenido extraído de Capsaicina.

El interés de este trabajo es aportar información sobre que variedad es más interesantes a la hora de producir capsaicinoides para aplicaciones en la alimentación o en el aislamiento de compuestos naturales.

CAPITULO I:

GENERALIDADES

1.1 Formulación del problema

El rocoto es una especie cosmopolita, que en el Perú es cultivada en la costa, sierra y selva; creciendo inclusive como maleza en cultivos agrícolas. Este ha tenido una larga historia para la humanidad con usos como comida, aditivo y es una conocida planta medicinal. Una de sus mayores características es la sensación de ardor y pungencia que se siente al ser ingerido o tener contacto directo a la piel, esta sensación es atribuida por compuestos llamados capsaicinoides, en especial a la Capsaicina.

La Capsaicina es el principal metabolito secundario del genero *Capsicum* con gran importancia, diversidad de usos medicinales y actividad biológica. ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾ La Capsaicina también favorece la eliminación de la sustancia P, responsable de los mecanismos nerviosos que participan en la transmisión del dolor desde la periferia hasta el sistema nervioso central. Es por esta razón que se usa tópicamente sobre todo tipo de “algias” a través de la disminución en la concentración de sustancias químicas que participan en la transmisión del dolor. ⁽⁴⁾

Sin embargo en el Perú, existen muy pocos estudios referentes a la concentración y métodos extractivos de Capsaicina en rocotos. Así es importante probar mediante investigaciones la existencia de Capsaicina en el rocoto, los cuales traigan consigo considerable interés en esta planta como una fuente alternativa de Capsaicina para poder desarrollar a partir de esta muchas variables como serian, Capsaicina en oleoresina pura con aplicaciones farmacéuticas en el ámbito de investigación, aditivos para salsa picante, compuestos bioactivos de interés industrial, sprays de defensa, etc. Así mismo, se propone utilizar un método extractivo rápido y eficaz para determinar la existencia y cuantificar la presencia de Capsaicina en rocoto fresco.

1.2 Hipótesis

Dado que al “Rocoto”, *Capsicum pubescens* se le atribuyen propiedades benéficas sobre la salud del ser humano dependientes de su contenido de Capsaicina; es probable que la cuantificación de este compuesto activo, incremente su importancia comercial y biotecnológica.



1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Extraer y cuantificar Capsaicina en siete variedades de “Rocoto”, *Capsicum pubescens* de la localidad de Arequipa promisoriamente seleccionadas del Instituto Nacional de Innovación Agraria, estación de Santa Rita de Siguan, Arequipa, Perú, 2014.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente la especie vegetal nativa mediante descriptor IPGRI para *Capsicum spp.*
- Determinar las condiciones óptimas y más eficientes para método extractivo de extracción asistida por ultrasonido, así como el solvente óptimo para la obtención de Capsaicina en la especie vegetal.
- Proponer un método por HPLC para la determinación de Capsaicina en muestras de *Capsicum Pubescens*.
- Determinar la proporción promedio de Capsaicina de las 7 variedades de rocoto, *Capsicum pubescens* nativas de la localidad de Arequipa.

1.4 Variables de estudio

1.4.1 Variables Independientes

Las variables independientes en este estudio se muestran en la tabla N°1.

Tabla N°1. Variables independientes.

Variable	Indicador
7 Variedades de rocoto	Código de clasificación de cada variedad

1.4.2 Variables Dependientes

Las variables dependientes en este estudio se muestran en la tabla N°2.

Tabla N°2. Variables dependientes.

Variable	Indicador
Concentración de Capsaicina en el extracto	Contenido de Capsaicina

1.5. **Justificación**

Es necesario el aporte de información científica sobre plantas medicinales en el Perú, para que bajo conocimientos científicos establecidos, entender su mecanismo de acción y poder así promover el desarrollo a nivel industrial de las mismas.

El presente trabajo se centra en el análisis del compuesto Capsaicina en *Capsicum Pubescens* y bajo el desarrollo de una técnica de aislamiento cuantificación y determinación, promover este fruto como una fuente rica en este compuesto, teniendo como visión futura, el desarrollo y validación de ingredientes funcionales para su aplicación en la industria agroalimentaria y farmacéutica.

Social: Con los resultados obtenidos se puede lograr en un futuro la implementación, el desarrollo y validación de ingredientes funcionales para su aplicación en la industria agroalimentaria y farmacéutica, siendo una de las primeras ciudades del Perú en innovar con la aplicación científica de este compuesto.

Económica: Con el uso de este método extractivo, las empresas ahorrarían dinero ya que esta tecnología se presenta como rentable y de corto tiempo de análisis, ya que la materia prima utilizada es nativa y de fácil obtención.

CAPITULO II:

MARCO TEORICO

2.1 Género *Capsicum*

Este género posee los datos culinarios más antiguos de la historia de la humanidad que data de 7000 años. El primer contacto fue verificado en México por el arqueólogo R. S. Mac Neish, quien encontró semillas de una antigüedad de 7500 años. Cristóbal Colón y el médico Diego Chanca, fueron los primeros en describirla durante su segundo viaje en 1493. Aún más, de Europa se devolvió hacia el continente americano, llegando a Estados Unidos en lugar de provenir de América del Sur o México. ⁽⁵⁾

Estudios han demostrado que el género *Capsicum* es originario de América del Sur y América Central. ⁽⁶⁾ Los hallazgos arqueológicos lo relacionan con las civilizaciones Maya y Azteca en México y precolombinas de América del Sur. Las evidencias se remontan hacia unos 7.000 – 4000 años en las cavernas de Tamaulipas y Tehuacan en México, en América Central y en Perú. ⁽⁷⁾ El último reporte dado por BBC News, dice que se encontraron restos de semilla al suroeste del Ecuador en la península de Santa Elena donde usaban el ají para el consumo o intercambio con el Perú, el reportaje afirma que el uso de este producto se realizó primero en la zona norte del Perú antes que en los altiplanos peruanos o en México. ⁽⁸⁾

En su etimología existen diferentes vocablos para referirse a las distintas variedades del género *Capsicum* en el Perú. Por ejemplo se emplea el vocablo ají o pimiento, para indicar a todas las especies del género *Capsicum* que se refiere a materiales picantes, mientras que para los no picantes se utiliza pimentón. ⁽⁹⁾

El nombre del género *Capsicum* podría derivarse de la palabra capsá (caja) teniendo como referencia la forma del fruto. ⁽¹⁰⁾ Asimismo los vocablos Kapso, que significa picar, y Kapsakes cuyo significado es cápsula ayudarían a formar el nombre. ⁽¹¹⁾

El género *Capsicum* junto con otros 84 géneros más, constituye la familia Solanáceae; entre las cuales se encuentran el tomate, la papa, el tabaco, la berenjena,

el lulo, y la uchuva. ⁽¹²⁾ Las especies del género *Capsicum* son diploides y poseen doce pares de cromosomas. ⁽¹³⁾

Existen cinco especies cultivadas del género: *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., y *C. pubescens* R. & P. ⁽¹⁴⁾ Se ha reportado que las especies cultivadas fueron domesticadas dentro de los últimos 800 años y ellas tienen tres centros de origen: a) México y Guatemala para *C. annuum*; b) Región amazónica para *C. chinense* y *C. frutescens* y c) Regiones altas de Bolivia y Perú para *C. baccatum* y *C. pubescens*. El proceso de domesticación se presenta por causa de la selección, el hombre interfiere en el proceso natural de la especie, por lo cual se hace difícil establecer las asociaciones entre las especies domesticadas y silvestres. ⁽¹⁰⁾



Figura N°1. Diversidad de frutos del género *Capsicum*

2.2 Descripción botánica del género *Capsicum*

2.2.1 Características morfológicas del género *Capsicum*

El género *Capsicum* comprende un conjunto de plantas semi arbustivas perennes, pero de cultivo anual. Alcanza entre 0.3 y 1.5 metros de altura, dependiendo principalmente de la variedad, de las condiciones climáticas y de la fertilización. La

inflorescencia está constituida por flores hermafroditas, pentabuladas con cinco anteras soldadas y un estigma. La longitud del estilo puede variar de acuerdo con la variedad o especie. En los tipos silvestres el estilo es más largo que los estambres, longistilas; mientras que en las domesticadas, es usualmente más corto, brevistilas. Las especies cultivadas se consideran autógamas. Sin embargo, existen altos porcentajes de polinización cruzada. ⁽¹¹⁾

La descripción del género *Capsicum* en su totalidad se realiza mediante la aplicación de los descriptores estandarizados propuestos por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Tradicionalmente algunos caracteres importantes han sido los de la pungencia, color, forma, sabor, tamaño y por el uso para el que puedan ir destinados. ⁽¹⁵⁾

2.2.2 Características de la flor

El género *Capsicum* presenta diferentes colores de flor. En especies de este género, se definen dos grupos de flores: blancas y púrpuras. En el grupo de flores blancas hay dos subgrupos: El constituido por *C. baccatum* y el que agrupa a *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*. El grupo de flores púrpuras se encuentran las especie *C. eximium*, *C. cardenasii* y *C. pubescens*. ⁽¹⁶⁾



Figura N°2. Características de flor y fruto para diferentes especies del genero *Capsicum*. Línea superior (izquierda a derecha): flores de *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, and *C. pubescens*. Línea inferior (izquierda a derecha): frutos de *C. annum* (cv Jalapeno), *C. frutescens* (cv Tabasco) *C. baccatum*, and *C. pubescens*.

2.2.3 Características del fruto

El fruto de *Capsicum* es una baya con características muy variables. El peso fluctúa entre unos pocos gramos hasta medio kilo.

Tabla N°3. Nombres comunes de diferentes variedades de especies domesticadas del género *Capsicum*. ⁽¹¹⁹⁾

Especie domesticada	Nombres populares		Figura del fruto
<i>C. Pubescens</i>	<i>Rocoto</i> <i>Luqutu</i> <i>Chile de Cera</i> <i>Chile</i>	<i>Manzano</i> <i>Perón</i> <i>Rocoto Rojo</i>	
<i>C. Annuum</i>	<i>Chiltepín</i> <i>Chile Soltero</i> <i>Chile Loco</i> <i>Chili Pepper</i>	<i>Bell Pepper</i> <i>Paprika</i> <i>Cayenne</i> <i>Halapenos</i> <i>Chilli Pepper</i> <i>Christmas Pepper</i>	
<i>C. Frutescens</i>	<i>Bird's Eye</i> <i>Malagueta</i> <i>Pepper</i> <i>Malawian</i> <i>Pepper</i>	<i>Kambuzi Pepper</i> <i>Thai Pepper</i> <i>Chilli Padi</i> <i>Bird's Eye Chilli</i> <i>Siling Labuyo</i>	
<i>C. Chinense</i>	<i>Chile</i> <i>Habanero</i> <i>Ají Limo</i> <i>Trinidad</i> <i>Scorpion</i> <i>Rocotillo</i> <i>Jamaican</i> <i>Adjuma, Red</i> <i>Dominica</i> <i>Goat Pepper</i>	<i>Yellow Lantern Chilli</i> <i>Red Savina</i> <i>Bhut Jolokia</i> <i>Habanero</i> <i>Congo Pepper</i> <i>Hot Bonda</i> <i>Man Jacques</i> <i>Rocotillo</i> <i>Datil.</i> <i>Scotch Bonnet</i>	
<i>C. Baccatum</i>	<i>Ají Escabeche</i> <i>Ají Amarillo</i> <i>Ají Cristal</i> <i>Aji Amarilllo</i> <i>Amarillo Chilli</i>	<i>Brazilian Starfish</i> <i>Peppadew</i> <i>Bishop's Crown</i> <i>Wild Baccatum</i> <i>Lemon Drop</i>	

Los frutos del genero *Capsicum*, según la variedad pueden tomar formas redondas, acorazonadas, largas, cilíndricas, cónicas, rectangulares y hasta cuadradas. Hay

frutos inmaduros de color blanco, verde, café y hasta negro. En estado maduro predominan los frutos de color rojo, pero también los hay de color marfil, amarillo, verde, anaranjado, café, lila, morado y negro. En la placenta se disponen numerosas semillas pequeñas y de color crema a pardo, a café oscuro y marrón. ⁽¹¹⁾

La primera medida de la pungencia en frutos del género *Capsicum* fue el test de Scoville, desarrollado por Wilbur Scoville en 1912. ⁽¹⁷⁾ Sin embargo la cromatografía líquida de alta performance (*HPLC*) ha desplazado el método organoléptico ya que el método *HPLC* se considera el método más eficaz y preciso para determinar la cantidad de capsaicina y la cual se emplea para determinar la pungencia una muestra expresadas como unidades Scoville SHU. ^{(18), (19), (20), (21)}

2.3 Rocoto

La especie *Capsicum Pubescens* es llamado comúnmente “Rocoto” en países como son Perú y Chile. Locoto es el nombre utilizado en Bolivia derivado del quechua rukutu o luqutu, pimienta también es un nombre utilizado para diferentes clases de *Capsicum Pubescens* y *Capsicum Annuum* en Argentina, Chile de cera, Chile manzano es el nombre utilizado en México. ⁽⁶⁾

Tabla N°4. Información general del rocoto, *Capsicum pubescens*. ⁽¹²⁰⁾

Información General	
Símbolo:	CAPU38
Grupo:	Dicotiledónea
Familia:	Solanaceae
Status Nativo	Ninguna
Documentación de datos	1265

Perteneciente a la familia Solanáceas, el fruto del rocoto puede ser rojo, amarillo, verde o marrón, y se distingue de los otros ajíes por contener en algunos casos semillas de color negro, únicas en el género *Capsicum*. Tiene un sabor picante, aunque también ligeramente dulzón. ⁽²²⁾

Contiene un principio activo llamado Capsaicina, que brinda múltiples beneficios para la salud. Es un fruto relativamente picante ya que su rango en la escala Scoville se ubica entre 12.000 SHU a 50.000 SHU. ⁽¹²¹⁾ ⁽¹²²⁾

Las zonas de producción son los valles andinos, la época de siembra es todo el año teniendo como ámbito un clima templado, favoreciendo una temperatura óptima que fluctúa entre los 18 a 20° C con una humedad relativa baja. ⁽²³⁾

En base a la primera clasificación hecha para el *Capsicum pubescens* por Ruiz y Pavón en 1794, en un estudio que demoró un promedio de 7 años, se pudo clasificar el rocoto de la forma mostrada en la tabla N°5. ⁽²²⁾

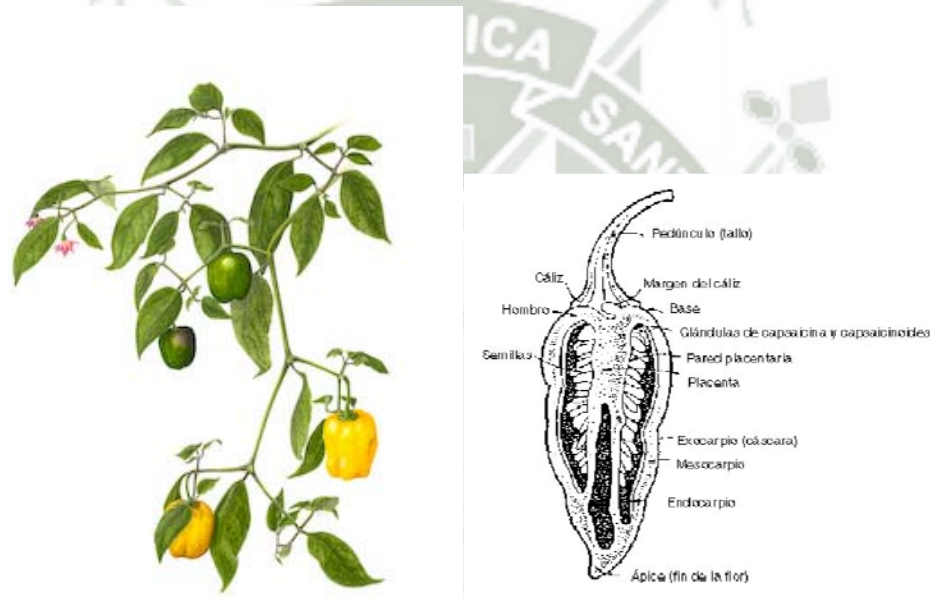


Figura N°3. Descriptor de *Capsicum pubescens*. ⁽⁵⁾

2.3.1 Taxonomía

Se trata de una planta herbácea o arbustiva, de tronco leñoso y ramificación dicotómica, con hojas alternadas, rugosas pubescentes. La cosecha se lleva a cabo cuando presenta una coloración de fruto verde o maduro. ⁽²⁴⁾

El fruto es una baya seca, aunque son frecuentes las variedades con pulpa y algo jugosas. En cuanto a su color, tamaño y forma, es muy variable, de acuerdo a sus características genéticas. ⁽²²⁾

El origen del rocoto, como del resto del género los *Capsicum* es netamente americano, aunque existen dudas y debates si es de procedencia Sudamericana o Centroamericana. Sin embargo, se cree que el *Capsicum pubescens* tiene su origen en la zona andina de Perú y Bolivia, donde se pueden encontrar la mayor variedad de especies, tanto silvestres como cultivadas, contando con una abundante producción. ⁽⁵⁾

Tabla N°5. Taxonomía de *Capsicum pubescens*. ⁽¹²³⁾

Rango	Nombre científico y nombre común
Reino	Plantae– Planta
Sub Reino	Tracheobionta– Planta vascular
Super División	Spermatophyta– Planta de Semillas
División	Magnoliophyta– Planta que florece
Clase	Magnoliopsida– Dicotyledonea
Sub clase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae– Familia de las papas
Genero	<i>Capsicum</i> - pimientos
Especie	<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz & Pav.– rocoto

2.3.2 Condiciones de cultivo del rocoto

Este cultivo crece a temperaturas cálidas, entre 20 y 29°C y entre 300 a 600 m.s.n.m. las cuáles serían sus condiciones óptimas pero produce muy buenos rendimientos con temperaturas de hasta 40°C y desde 60 hasta 2,600 m.s.n.m. En cuanto a precipitaciones, es preferible escasa lluvia para evitar problemas de contagio bacteriano y otras enfermedades. ⁽²³⁾

En la temporada de producción. La tierra requerida se recomienda de preferencia suelos francos pero produce muy bien en suelos pesados hasta suelos arenosos. Con suelos extremos arcillosos o arenosos se requiere un poco más de manejo pero

también produce bien. Para este cultivo la mejor época de siembra es todo el año. Hay unos meses que son menos difíciles pero se puede producir todo el año con excelente rentabilidad. ⁽²³⁾

2.3.3 Producción nacional por regiones

Para el año 2011 la producción nacional de rocoto fresco fue de 10504 toneladas, si bien ese año disminuyó en un 8.24% con respecto al año anterior, el rendimiento a tenido un ascenso considerable de más de 2 mil por ciento. Asimismo se observa un incremento en el precio de 48% siendo este de S/. 2.31 por Kg. promedio durante el año 2011. ⁽²³⁾

El principal departamento productor de rocoto fresco es Pasco, en el año 2011 superó las 6.7 mil toneladas; le siguen los departamento de Puno y Cusco cuya producción en ambos sobrepasaron las mil toneladas anuales como se puede apreciar en la tabla N°6. ⁽²³⁾

Tabla N°6. Producción nacional. ⁽²³⁾

Variables	2008	2009	2010	2011
Sembrada (ha)	122	228	151	208
Cosechada (ha)	122	1.385	1.181	40
Producción (t)	3.575	11.568	11.447	10.504
Rendimiento (Kg /ha)	2.693	8.353	9.691	264.246
Precio (S./ k g)	1.00	1.32	1.56	2.31

2.3.4 Composición química del rocoto

Los rocotos presentan una enorme variedad de compuestos, muchos de ellos con unas marcadas propiedades antioxidantes e importantes efectos biológicos. ⁽²⁵⁾

Los niveles de estos compuestos pueden variar dependiendo de la variedad de rocoto de que se trate, del estado de maduración que presente o de las condiciones de crecimiento que haya tenido. El componente mayoritario de los rocotos está representado por los hidratos de carbono. También contiene proteínas en pequeña cantidad y muy pocos lípidos. ⁽²⁶⁾ Los rocotos rojos constituyen una fuente buena de

vitamina C, vitamina A y licopeno, constituyéndose en uno de los alimentos desintoxicantes más importantes. ⁽⁵⁾

De hecho, si se comparamos con los cítricos (naranjas, limones, pomelos, etc.), los rocotos nos proporciona más del doble de vitamina C, por peso de fruto. También son una fuente vegetal rica en vitamina A y, en menor medida, en otras como E, B1 y ácido fólico. ⁽²⁷⁾

Tabla N°7. Compuestos atribuidos al rocoto.

Compuesto	Referencia	
Carotenoides entre los que destacan: xantofilas, b-caroteno, luteína, capsantina, capsorrubina, criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, neoxantina	Márkus,1999	(28)
	Zúñiga,2005	(29)
Vitamina A	Kidmose,2006	(30)
Vitaminas (B) tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6).	Leonard,2001	(31)
Ácido ascórbico (vitamina C)	Navarro,2006	(32)
Tocoferol (vitamina E), que se encuentra en concentraciones desde 3 a 250 mg/100g de pimiento seco	Osuna-García,1998	(33)
	Koch,2002	(34)
Ácidos fenólicos libres : protocatéquico, clorogénico, cumárico, ferúlico, cinámico, cafeico, etc	Estrada,2000	(35)
Ácidos orgánicos: málico, oxálico, cítrico, fumárico, quínico, etc	Luning,1995	(36)
Azúcares solubles: glucosa, fructosa, etc.	López-Hernández,1996	(37)
Flavonoides: quercetina, luteolina, etc.	Lee,2005	(33)
	Materska,2003	(38)
Lípidos.	Bekker,2001	(39)
Compuestos volátiles: aldehídos, cetonas, alcoholes, pirazinas, etc.	Luning,1994	(40)
	Zimmermann,2000	(41)
Capsaicinoides: Capsaicina, dihidrocapsaicina, entre otros.	Iwai,1979	(26)
Capsinoides: capsiato, dihidrocapsiato, entre otros.	Yazawa,1989	(42)

Pero además de su característico color rojo, este nos indica también que es un alimento rico en carotenos. Algunos de ellos, como el b-caroteno, pueden ser transformados en vitamina A. Como las verduras en general, los rocotos son ricos en fibra dietética y de algunas vitaminas.

Tabla N°8. Composición de la hortaliza en datos de análisis dietéticos practicados por el Departamento de Nutrición del Perú en 1978. ⁽⁵⁾

Por 100 g de peso neto de rocoto	Mínimo	Máximo
Agua	20.70 g	93.10 g
Hidratos de Carbono	5.30 g	63.80 g
Proteínas	0.80 g	6.70 g
Extracto etéreo	0.30 g	0.80 g
Fibra	1.40 g	23.20 g
Cenizas	0.60 g	7.10 g
Calcio	7.00 mg	116.00 mg
Fósforo	31.00 mg	200.00 mg
Hierro	1.30 mg	15.10 mg
Caroteno	0.03 mg	25.20 mg
Tiamina	0.03 mg	1.09 mg
Riboflavina	0.07 mg	1.73 mg
Niacina	0.75 mg	3.30 mg
Ácido Ascórbico	14.40 mg	157.50 mg
Capsaicina	150.00 mg	335.00 mg

2.3.5 Usos tradicionales del rocoto

Los usos tradicionales del rocoto van en una amplia gama, desde compuesto principal de comidas típicas, hasta su más simple consumo fresco o seco, como un condimento o especia en comidas típicas. Existe una gran gama de productos transformados que se usan en la alimentación humana, en encurtidos, enlatados, conservas, jaleas, en pastas, en salsas y congelados.

También han sido ampliamente utilizados en alimentación como colorantes y por sus propiedades picantes. Los rocotos picantes se utilizan como aditivos alimenticios y son muy valorados por sus atributos sensoriales del color, picor y aroma.



Figura N°4. Salsa de rocoto

Como se menciona tiene un importante uso gastronómico, siendo usado como ingrediente principal para diversos usos en la tan aclamada gastronomía Peruana como son en el pisco sour, mermelada, cebiche, tiradito, mermelada, galletas, rocoto relleno, escribano y como acompañante para cualquier comida. Asimismo los rocotos al ser parte de la memoria Peruana tienen otras muchas aplicaciones a las cuales se le atribuyen diversas propiedades.



Figura N°5. Rocoto relleno

F. Protector estomacal

El consumo habitual de rocoto se recomienda para el tratamiento de las úlceras, gastritis, colitis y en general beneficia al sistema digestivo. Porque los jugos

gástricos humanos al igual que la saliva de algunos mamíferos tienen la acidez suficiente para neutralizar su picor. La Capsaicina estimula la segregación de jugos gástricos y propicia la acumulación de lípidos y bicarbonatos en la mucosa del estómago, fortaleciéndola y facilitando el proceso digestivo. Además, la salivación extra que produce en la boca contribuye a una mejor digestión en general. ⁽²³⁾

G. Desinflamante y antibiótico

Por ello las pepitas del ají se empleaban antiguamente para combatir el dolor de muelas. Sus propiedades desinflamantes combinadas con las digestivas lo convierten en un poderoso remedio para las hemorroides y dolores producidos por artrosis. ⁽²³⁾

H. Productor de endorfinas

La sensación de dolor controlado que el picor del rocoto produce en la lengua es una respuesta que nuestro organismo produce endorfinas que inhiben ciertas partes del cerebro produciendo una sensación de placer que genera cierta adicción difícil de describir. ⁽²³⁾

I. Tratamiento de Hipertensión

Actúa como dilatador de los vasos sanguíneos, se aconseja para aliviar el malestar y bajar la presión de las personas que sufren este mal. ⁽²³⁾

J. Fuente de vitamina C

Un rocoto posee una cantidad de vitamina C cuatro veces superior al de la naranja y al igual que otros frutos sus propiedades antioxidantes son parte esencial de una dieta sana, aconsejada para prevenir el cáncer. ^{(23), (118)}

2.4 Capsaicina

Los capsaicinoides son los compuestos que le dan el sabor picante a los frutos del género *Capsicum*, los cuales son un grupo de amidas ácidas formados a partir de la vanillilamina y ácidos grasos de 8 a 13 átomos de carbono, entre los cuales destacan dos capsaicinoides.

La Capsaicina, con formula (6*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil-6-enamida representa aproximadamente el 80 % de los capsaicinoides totales presentes en las variedades picantes del género *Capsicum*.⁽³⁾

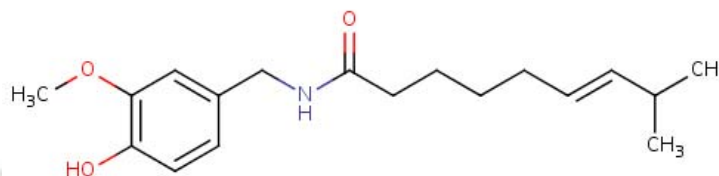


Figura N°6. Molécula de Capsaicina. ⁽¹²⁴⁾

La dihidrocapsaicina, con formula *N*-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) methyl]-8-methylnonanamide que es un dihidro derivado de la Capsaicina, esta representa por lo general el 20% de los capsaicinoides totales presentes en las variedades picantes del género *Capsicum*.^{(125) (126)}

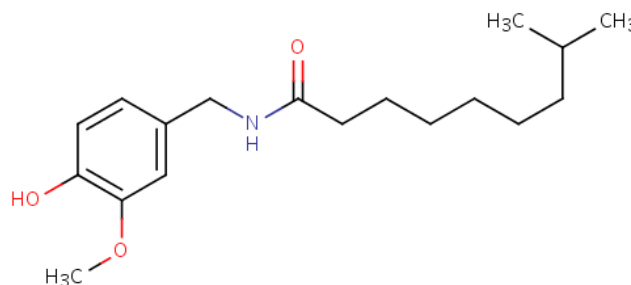


Figura N°7. Molécula de Dihidrocapsaicina. ⁽¹²⁵⁾

Además de estos dos compuestos mayoritarios, más de 12 capsaicinoides han sido encontrados como compuestos minoritarios. ⁽⁴³⁾

La Capsaicina compuesto con nombre IUPAC (6*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil-6-enamida se identifica como el principio picante mayoritario en frutas de las plantas del genero *Capsicum*, esta se encuentran entre las especies más consumidas en gran medida en todo el mundo. El contenido de Capsaicina de frutos del genero *Capsicum* verdes y rojos varía de 0.001 a 1%. La Capsaicina provoca

numerosos efectos biológicos y por lo tanto ha sido objeto de extensas investigaciones desde su identificación inicial en 1919. Una de las propiedades fisiológicas más reconocidas de la Capsaicina, es sus efectos selectivos en la parte periférica del sistema nervioso sensorial, sobre todo en las primarias neuronas aferentes. ⁽⁴⁴⁾

Otros nombres con los que se le conoce la Capsaicina son : Capsaicin, Zostrix, E-Capsaicin, Styptysat, Axsain, Qutenza, Capsaicine, Transacin, E-CAPSAICIN Isodecenoic acid vanillylamide, Capsaicin, NGX-4010, Caswell No. 158, neurotoxic, trans-Capsaicin, Capsaicin patch, trans-8-Methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, ZOSTRIX (TN), 8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamide, HP, UNII-S07O44R1ZM, (E)-8-Methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, depletes Substance P, 8-Methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide. ⁽¹²⁴⁾

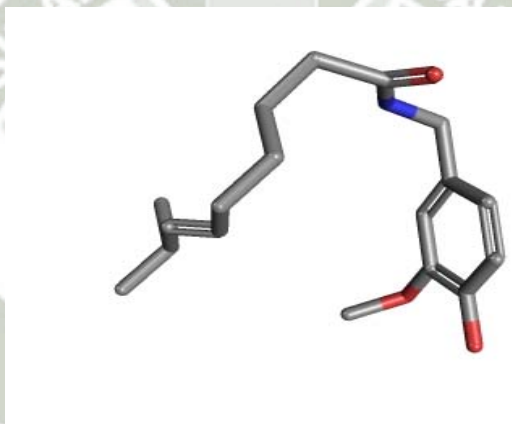


Figura N°8. Molécula de Capsaicina en modelamiento 3D de la Capsaicina. ⁽¹²⁴⁾

2.4.1 Características

La Capsaicina, posee una fórmula molecular $C_{18}H_{27}NO_3$, a la cual le corresponde un peso molecular de 305.40 g/mol, y es identificada por un número CAS 404-86-4, su forma cristalográfica pertenece al sistema monoclinico, de láminas rectangulares, su punto de fusión es $65^{\circ}C$ y el de ebullición está entre $210-220^{\circ}C$, posee un color rojo-naranja, pudiéndose almacenar durante años en forma estable. La Capsaicina es ligeramente soluble en agua, pero soluble en grasas, alcoholes y aceites. ⁽⁴⁵⁾

2.4.2 Distribución y Función vegetal

En cuanto a lo que refiere a la evolución en el contenido en capsaicinoides durante la maduración y localización en la placenta, se han presentado una gran cantidad de estudios que presentan los cambios en el contenido de capsaicinoides a lo largo del desarrollo de la planta, en la maduración del fruto y durante su envejecimiento. Muchos de estos estudios están relacionados con la actividad de las peroxidasas, que son las enzimas que se presuponen actúan en la degradación de estos compuestos. ⁽⁴⁶⁾

Las peroxidasas catalizan la oxidación de un gran número de estructuras aromáticas. La acumulación de capsaicinoides está especialmente asociada con el desarrollo de un órgano particular en estas plantas, que es el fruto. Iwai y colaboradores determinaron que los capsaicinoides se biosintetizaban en las células de la placenta de los frutos de las variedades picantes del género *Capsicum*. ⁽²⁶⁾

Estos compuestos se producen a partir de la vía del ácido cinámico. Iwai y colaboradores fueron los primeros en sugerir que la producción de capsaicinoides incrementaba durante la maduración hasta un máximo, y a partir de ese máximo se producía un rápido vuelco en la tendencia, presentándose una degradación de estos compuestos superior al 60 %. También se han encontrado capsaicinoides en otras partes de las plantas, como las hojas y el tallo, pero en mucha menor cantidad a la que se encuentra en la placenta. ⁽²⁶⁾

Bernal y colaboradores realizaron estudios in vitro con peroxidasas y sugirieron que estas enzimas están envueltas en la degradación de los capsaicinoides. Estos mismos investigadores demostraron que las peroxidasas de los frutos del genero *Capsicum* eran las responsables de la oxidación de la Capsaicina y de la dihidrocapsaicina. ⁽⁴⁷⁾ Se demostró además que la oxidación de la dihidrocapsaicina por medio de las peroxidasas era estrictamente dependiente de la presencia de peróxido de hidrogeno. ⁽⁴⁸⁾

Estos mismos autores comprobaron además que al igual que la Capsaicina y los capsaicinoides, las peroxidasas están principalmente localizadas en la placenta del fruto y en los hilillos que salen de la placenta. Estos resultados fueron usados por estos autores como prueba de que son las peroxidasas las enzimas que están

envueltas en la degradación de los capsaicinoides una vez que han alcanzado el máximo de concentración. ⁽⁴⁹⁾

Contreras-Padilla y colaboradores realizaron un estudio sobre el cambio en el contenido de capsaicinoides durante el desarrollo, maduración y el envejecimiento de tres variedades de pimientos picantes en relación con la actividad de las peroxidasas. Las variedades estudiadas poseían una elevada pungencia. Estas variedades fueron Habanero (*Capsicum chinense*), De árbol (*Capsicum annum*), y Piquín (*Capsicum annum*). El contenido en capsaicinoides era más abundante en los frutos del habanero, seguido por del árbol y por último piquín. El contenido en Capsaicina era superior al contenido en dihidrocapsaicina en las tres variedades. El contenido en capsaicinoides (Capsaicina y dihidrocapsaicina) se incrementa continuamente y alcanza su pico máximo 45-50 días después de que aparezca el fruto en la variedad habanero y de árbol y después de 40 días en el piquín. Después de este tiempo, el contenido en capsaicinoides empieza a decaer. La actividad de las peroxidasas se incrementa al tiempo que la concentración de capsaicinoides decae. El incremento en el contenido en capsaicinoides siempre coincide con una disminución en la actividad de las peroxidasas. Por el contrario, la disminución en la concentración de los capsaicinoides siempre coincide con un elevado incremento de la actividad enzimática de las peroxidasas. ⁽⁴⁶⁾

Estrada y colaboradores en el año 2000 realizaron un estudio sobre la evolución del contenido en capsaicinoides, ácidos fenólicos y lignina a lo largo de la maduración en pimientos del tipo *Capsicum annum*, padrón. Los capsaicinoides eran detectados 14 días después de la floración, en el primer estado de crecimiento del fruto. Este nivel bajo en capsaicinoides se mantenía durante unos días, pero ya en el día 28 tras la floración, se observaba un incremento moderado en la cantidad de capsaicinoides. Finalmente en los últimos estados del desarrollo del fruto, sobre el día 42 tras la floración, los pimientos presentaban un elevado aumento en el contenido en capsaicinoides. ⁽⁵⁰⁾

El nivel de capsaicinoides en este tipo de pimientos es inferior que en otras muchas variedades, pero el modelo de acumulación es similar. ⁽⁴⁶⁾

2.4.3 Síntesis

Trabajos publicados sobre la biosíntesis de estos compuestos han demostrado que la parte vanillilamina de la molécula es sintetizada a partir de la vía de los fenilpropanoides y la parte procedente del ácido graso proviene de los aminoácidos leucina, valina o isoleucina. El paso final combina ambas partes y se piensa que ocurre en las membranas de las vacuolas de las células de la placenta del fruto.⁽⁵¹⁾ De esta forma los capsaicinoides se acumulan en las vacuolas y posteriormente se produce una secreción extracelular.⁽⁵²⁾ Se sabe que los capsaicinoides son biosintetizados y acumulados en la placenta del pimiento. Se ha examinado la estructura celular de la placenta usando un microscopio óptico y se ha observado que durante la maduración tienen lugar algunos cambios morfológicos en el tejido epidérmico de la placenta. Parece ser que las células epidérmicas de la placenta son el lugar donde se acumulan los capsaicinoides. También se encuentran capsaicinoides en otros tejidos de la planta como en el pimiento (pericarpio) o en las semillas, pero en cantidades mucho menores que en la placenta.⁽⁵³⁾

Estrada y colaboradores en el año 2001 estudiaron y relacionaron el contenido en capsaicinoides y compuestos fenólicos en diferentes estados de maduración del pimiento. Observaron que la Capsaicina, la dihidrocapsaicina y la nordihidrocapsaicina presentaban el mismo patrón de acumulación en todos los estados, pero la homodihidrocapsaicina solo aparecía en los últimos estados de maduración del fruto.⁽⁵⁴⁾

Estrada y colaboradores en el 2002 también estudiaron la composición de los capsaicinoides en distintos órganos de la planta del pimiento en relación con el periodo de maduración de la misma. Hicieron el estudio con plantas del tipo *Capsicum annum*. Padrón. Observaron que las plantas presentaban un gradiente espacial en el contenido de compuestos fenólicos, y particularmente en el contenido en capsaicinoides, a lo largo del tallo de la planta. El contenido en capsaicinoides era más abundante en aquellos frutos pertenecientes a las partes altas de las plantas, que en aquellos que estaban en la parte baja o en la parte media de la misma. Analizaron el contenido de Capsaicina y de dihidrocapsaicina, los dos capsaicinoides más abundantes de los pimientos, comprobando que la proporción de Capsaicina era

siempre superior a la proporción de dihidrocapsaicina en los frutos. En este estudio comprobaron que los capsaicinoides estaban presentes en todos los órganos de la planta, como el tallo y las hojas. Tanto en el tallo como en las hojas, la proporción individual de capsaicinoides (Capsaicina y dihidrocapsaicina) era diferente a la que presentan los frutos, siendo en estas partes de la planta la dihidrocapsaicina el capsaicinoide más abundante. Para comprobar si los capsaicinoides presentes en las hojas y en el tallo procedían de los frutos se realizó un estudio que consistía en eliminar las flores de las plantas, con lo que se impedía la formación del fruto. De esta forma no se encontraron capsaicinoides ni en el tallo ni en las hojas de las plantas, por lo que se sugiere que los capsaicinoides se generan únicamente en el fruto. ⁽⁵⁵⁾

Kirschbaum-Titze y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio sobre el contenido en capsaicinoides de frutos individuales provenientes de la misma planta y recolectados al mismo tiempo tras la floración. Estos frutos poseían un amplio rango de valores, pero presentando un modelo bastante uniforme en la relación existente entre los distintos capsaicinoides estudiados (Capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina). Comprobaron que se producían cambios en el contenido de capsaicinoides dependiendo de la época en el que se recogiera el fruto, transcurrido el mismo tiempo después de la floración dentro de los frutos de una misma planta. Se observa que el contenido en capsaicinoides de los pimientos recolectados entre junio y septiembre es mayor que el de los pimientos recolectados en octubre. ⁽⁵²⁾

Estrada y colaboradores estudiaron la cantidad de capsaicinoides, compuestos fenólicos solubles y contenido en lignina presentes en plantas de pimientos de Padrón (*Capsicum annum*) cultivadas con dos formas diferentes de fertilización. El nivel de fertilización no influyó en el crecimiento de las plantas. Se observó que el contenido en compuestos fenólicos libres y en lignina era superior en las plantas control (sin aporte complementario de fertilizantes minerales), que en aquellas que habían sido tratadas. Por el contrario, las plantas tratadas con un aporte suplementario de nutrientes minerales presentaban bastante mayor cantidad de capsaicinoides que aquellas que no habían sido tratadas. Se concluyó que la fertilización de las plantas alteraba el balance entre la síntesis de capsaicinoides por la planta y la acumulación de ligninas en las paredes celulares. ⁽³¹⁾ Estos mismos

autores estudiaron la cantidad de capsaicinoides sintetizados en plantas de pimientos tipo Padrón (*Capsicum annuum*) que habían sido cultivadas con distintos aportes de agua. La cantidad de capsaicinoides (Capsaicina y dihidrocapsaicina) en los pimientos procedentes de plantas con una deficiencia hídrica era superior que la de los pimientos procedentes de plantas control. Este aumento en el contenido en capsaicinoides se observaba especialmente en aquellas plantas que habían sufrido un mayor estrés hídrico. Los resultados de este experimento sugieren que las condiciones medioambientales, como puede ser el estrés hídrico, tienen un marcado efecto en la acumulación de los capsaicinoides en los pimientos. ⁽⁵⁶⁾

La heterogeneidad en el contenido en capsaicinoides entre frutos provenientes de plantas cultivadas en las mismas condiciones, o incluso entre frutos individuales recolectados de la misma planta con el mismo tiempo de maduración, conlleva que existen otros factores implicados, además de los genéticos, en la biosíntesis de los capsaicinoides, habiéndose demostrado que las condiciones ambientales influyen en el contenido en capsaicinoides. ⁽⁵⁷⁾

2.4.4 Aplicaciones y usos de Capsaicina

A. Efectos en la salud

La Capsaicina purificada, diluida cien mil veces, sigue siendo tan activa que aún es capaz de producir ampollas en la lengua, esta es la responsable de la sensación de ardor, e incluso dolor, en la mucosa oral. Estimula las secreciones gástricas y, si se usa en exceso, ocasiona inflamación. Se sabe que esta molécula es capaz de actuar sobre fibras no mielinizadas delgadas, activando a ciertas subpoblaciones de neuronas sensoriales. La Capsaicina también posee cualidades descongestivas y, a concentraciones adecuadas, favorece en el cerebro la producción de endorfinas, que son moléculas que promueven la sensación de bienestar. ⁽¹²⁷⁾

Una pequeña cantidad de Capsaicina incrementa la presión arterial y reduce el excesivo sangrado en cualquier parte del cuerpo. Además ayuda a quemar calorías. Se ha encontrado que 6 g de rocoto queman alrededor de 45 a 76 calorías extras. La Capsaicina actúa como un estimulante energético, haciendo que las adrenales incrementen ligeramente la producción de cortisona. ⁽⁵⁸⁾

La Capsaicina favorece a la digestión al estimular los jugos gástricos y biliares. Incluso los pimientos picantes han demostrado tener un efecto positivo en la prevención de úlceras de estómago. ⁽⁵⁹⁾ El mismo componente picante (Capsaicina) protege las membranas gástricas y parece impedir el desarrollo de úlceras tal como se ha demostrado en numerosos experimentos en animales. Dentro de las propiedades beneficiosas del pimiento para el aparato digestivo hemos de mencionar también sus propiedades antidiarreicas y antivomitivas. ⁽⁶⁰⁾ Sin embargo la ingestión de grandes cantidades de Capsaicina produce alteraciones bioquímicas e histopatológicas, incluyendo la erosión de la mucosa gástrica y la necrosis hepática. Incluso se cita en la bibliografía la muerte de un bebé de ocho meses como resultado de la ingestión de un remedio casero tomado como infusión de pimientos picantes en polvo. ⁽⁶¹⁾

Numerosas investigaciones han llegado a determinar el potencial mutagénico y la actividad carcinogénica que presenta la Capsaicina y los pimientos picantes, pero estos resultados son muy discordantes ⁽⁶²⁾, presentando efectos duales. Hay estudios que demuestran que la administración de Capsaicina en la dieta de ratones albinos provoca la aparición de tumores duodenales. ⁽⁶³⁾ Otros estudios sugieren que tanto la Capsaicina como los extractos de los pimientos picantes actúan como agentes cocarcinogénicos y promotores de tumores. ⁽⁶⁴⁾ Hay otros muchos estudios en los que el efecto cancerígeno y mutagénico de la Capsaicina no está tan claro. En muchos de estos estudios, se observa que la Capsaicina no posee las propiedades mutagénicas o carcinogénicas que presentan determinados compuestos. Estudios epidemiológicos llevados en Méjico, revelan que los consumidores de pimientos picantes tienen el mismo riesgo de padecer cáncer de estómago que aquellos que no los consumen. ⁽⁶⁵⁾

Por el contrario, en los últimos años, están apareciendo un gran número de estudios que apuntan al potencial quimiopreventivo que presenta la Capsaicina. Se ha comprobado que los extractos de pimientos picantes, o los capsaicinoides aislados bloquean los procesos de carcinogénesis y muta génesis. ⁽⁶⁶⁾ Se sugiere que la Capsaicina ejerce un efecto quimiopreventivo a través de la modulación del metabolismo de muchos compuestos cancerígenos y mutagénicos y sus interacciones con el ADN. Por ejemplo, los capsaicinoides protegen poderosamente la mutagénesis bacteriana producida por la aflatoxina B1. También se observa que el pretratamiento

tópico con Capsaicina en ratones atenúa el carcinoma de piel inducido por el vinil carbamato. ⁽⁶²⁾

En resumen, la Capsaicina posee un doble efecto en la inducción del cáncer y de las mutaciones. Aunque una pequeña cantidad de Capsaicina manifiesta o muy pocos o ningún efecto nocivo, una elevada ingesta de este compuesto está asociada con necrosis, úlceras e incluso cánceres. Por el contrario, la Capsaicina tiene la habilidad de alterar el metabolismo de muchos compuestos cancerígenos, lo cual proporciona una vía de aplicación de este compuesto en la quimio-prevención. ⁽⁶⁷⁾

Se ha demostrado que la Capsaicina induce apoptosis en celular tumorales por la activación de los receptores vanilloides tipo 1(VR1). Las propiedades quimiopreventivas y antitumorales que presenta la Capsaicina son anuladas en gran medida por su marcado carácter irritante. La Capsaicina puede inducir fácilmente la muerte celular en células con receptores vanilloides tipo 1(VR1). Esta muerte celular ocurre rápidamente, incluso con concentraciones de Capsaicina incapaces de inducir apoptosis en células tumorales que no poseen receptores específicos tipo 1(VR1). Por ello la aplicación terapéutica de la Capsaicina está restringida en este sentido, ya que produciría la muerte celular tanto de las células tumorales como de las sanas. ⁽⁶⁸⁾

B. Antioxidantes

Los pimientos son una magnífica fuente de antioxidantes susceptibles de ser utilizados en la dieta. ⁽⁶⁹⁾ Presentan no sólo compuestos antioxidantes muy extendidos en el mundo vegetal como pueden ser flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferoles, sino también constituyentes antioxidantes específicos como los capsaicinoides. ⁽⁷⁰⁾

Se conoce que la Capsaicina y la dihidrocapsaicina son capaces de inhibir la peroxidación lipídica catalizada por cationes Fe^{3+} y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad producida por cationes cobre. Este efecto es atribuido a la capacidad de estos compuestos para formar complejos con estos metales reducidos, actuando además como donadores de hidrógenos. La Capsaicina puede también prevenir la oxidación del ácido oleico a altas temperaturas. De igual forma que previene la

formación de hidroperóxidos lipídicos provenientes de la auto-oxidación del ácido linoleico. ⁽⁷¹⁾

C. Obesidad

La Capsaicina puede ayudar a combatir la obesidad mediante la reducción de la cantidad de calorías que se absorben en el intestino. La investigación, dirigida por el profesor Jong Won Yun en la Universidad de Daegu en Corea del Sur, sugiere que la Capsaicina puede causar pérdida de peso e impedir la acumulación de grasa mediante la estimulación de la expresión de ciertas proteínas degradantes de grasa, y estableciendo una regulación a la baja de otras proteínas que trabajan en la síntesis de grasa. ⁽⁷²⁾

D. Analgésico tópico contra el dolor

Se ha encontrado que la Capsaicina es capaz de reducir la "sustancia P", un químico que lleva los mensajes de dolor desde las terminales nerviosas de la piel al sistema nervioso central. Las investigaciones clínicas han demostrado que el 85 % de los pacientes a los que se ha aplicado crema de Capsaicina en sus zonas enfermas experimentaron una disminución sustancial del dolor, con solo una ocasional sensación de quemadura. Por esta propiedad está siendo investigado el uso de la Capsaicina en otros problemas de la piel que ocasionan dolor, tal el caso de los daños nerviosos de la diabetes, herpes zoster, dolor posquirúrgico etc. ⁽⁷³⁾ Se utiliza también contra los dolores reumáticos, las neuralgias y la osteoartritis. ⁽⁷⁴⁾

Una de las propiedades fisiológicas más importantes de la Capsaicina es su efecto selectivo sobre la zona periférica del sistema nervioso, particularmente sobre las neuronas aferentes primarias. La Capsaicina tiene el efecto de reducir la transmisión del impulso nervioso de dolor, lo que la hace una herramienta muy versátil en el estudio de este mecanismo. ⁽⁷⁴⁾

Por ello, la Capsaicina es usada terapéuticamente como analgésico tópico para el tratamiento de ciertos dolores de tipo periférico como pueden ser la artritis reumatoide, la neuralgia post-herpética ⁽⁷⁴⁾, neuropatías diabéticas y osteoartritis entre otros. ⁽⁷³⁾ Numerosas pruebas clínicas han revelado que el uso de cremas tópicas con un 0,025 % en Capsaicina mejora significativamente el dolor en pacientes con

artritis. Varias pomadas, cuyo ingrediente activo es la Capsaicina o la oleorresina proveniente de los pimientos picantes, se comercializan en la actualidad. ⁽⁷⁵⁾

E. Actividad anti-microbiana

Los capsaicinoides también se conocen por presentar unas marcadas propiedades antimicrobianas y anti-fúngicas. Cichewicz y colaboradores comprobaron que los extractos obtenidos a partir de pimientos picantes inhibían el desarrollo de determinados patógenos como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* y *Streptococcus pyogenes*. ⁽⁷⁶⁾

Molina-Torres y colaboradores encontraron que la Capsaicina inhibía además el crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum* además de *Bacillus subtilis*. ⁽⁷⁷⁾ También se ha demostrado que extractos de capsaicinoides presentan propiedades anti-bacterianas frente a *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁷⁸⁾, y frente a *Helicobacter pylory* entre otras. ⁽⁷⁹⁾

F. Antiinflamatorio

Los capsaicinoides presentan importantes propiedades anti-inflamatorias. En la bibliografía se recogen numerosos artículos hablando de las propiedades anti-inflamatorias que presenta la Capsaicina. ⁽⁸⁰⁾

Hay estudios que indican que la Capsaicina inhibe el desarrollo de procesos inflamatorios, al igual que mejora inflamaciones causadas en el estómago de ratas que han sido tratadas previamente con etanol. ⁽⁸¹⁾

Son unos potentes compuestos anti-inflamatorios “in vivo”. Como se sabe desde hace tiempo, la Capsaicina posee unas magníficas propiedades anti-inflamatorias. A pesar de ello, su uso queda restringido debido al marcado carácter picante e irritante que posee dicha sustancia. Se sabe que la Capsaicina es capaz de inhibir la activación del factor de transcripción NF-kB. El factor de transcripción NF-kB es una de las llaves reguladoras de los genes responsables de las respuestas inmunes y de las respuestas anti-inflamatorias en el organismo. El factor NF-kB es fuertemente activado en los órganos inflamados en diversas enfermedades. ⁽⁶⁸⁾

G. Autodefensa

La oleorresina proveniente de pimientos picantes es utilizada en productos de autodefensa como un arma no letal y de efectos inmediatos. Se calcula que cerca de 15 millones de americanos poseen algunos de estos productos de defensa personal. La exposición al spray de pimientos (capsaicinoides), produce respuestas fisiológicas muy intensas que se traducen en estornudos, desorientación, eritemas, lacrimación, ceguera temporal y un intenso dolor. Los síntomas de ceguera, sofoco y náusea desaparecen al cabo de 30 minutos sin dejar consecuencias nocivas.⁽⁸²⁾ La Capsaicina, dihidrocapsaicina y nonivamida son los capsaicinoides mayoritarios presentes en estos sprays, representando entre un 85 y un 95 % del total de capsaicinoides presentes en estos productos.⁽⁸³⁾

H. Otras aplicaciones

La Capsaicina actúa como un compuesto aleloquímico, causando la inhibición del crecimiento de la raíz y brotes de la alfalfa (*Medicago sativa*), del berro (*Lepidium sativum*), de la lechuga (*Lactuca sativa*), del garranchuelo (*Digitaria sanguinalis*), de la hierba timotea (*Phleum pratense*) y de la avena loca (*Lolium multiflorum*), y suprime sus germinaciones. Un incremento de la dosis de Capsaicina aumenta la inhibición. En este estudio se concluyó en que la efectividad de la Capsaicina en el crecimiento de las plantas difiere dependiendo de la especie y de la parte de la planta. Se sugiere además que la Capsaicina puede actuar como un compuesto aleloquímico con otras plantas.⁽⁸⁴⁾

Un uso muy importante de los frutos del género *Capsicum* el mundo, es el de extraerles color y utilizar el colorante naturalmente en cosméticos, pinturas y alimentos. Sin embargo el uso industrial más innovador de los frutos picantes es la extracción de su oleorresina. De esta se obtiene la Capsaicina pura. La Capsaicina tiene usos industriales diversos, en la alimentación humana y animal, en la medicina.⁽⁵³⁾

Alrededor de 1990 se encontraron reportes en los medios de comunicación de la adición de Capsaicina a las pinturas utilizadas en los cascos de los botes y en las

válvulas de los sistemas aguas municipales, para evitar el crecimiento de percebes y mejillones cebra. Esta historia no fructificó en esa época, pero ha vuelto a surgir como una medida científica por parte de Burlington Bio-Medical and Scientific Corporation of Farmingdale, New York, en donde se está desarrollando el método para la fabricación de grandes cantidades del denominado compuesto capsaicinoide. El compuesto incluye la presencia de Capsaicina y el anestésico lidocaína, la mezcla de estos compuestos la hace extremadamente picante e intensamente amarga. El propósito de crear este compuesto, es utilizarlo como un aditivo en pinturas, ya que es inocuo para la vida marina y muy efectivo en la inhibición del crecimiento de los percebes. ⁽¹²⁸⁾

La Capsaicina es usada ampliamente como repelentes de animales frente a pájaros y mamíferos salvajes para la protección de huertos, semilleros, jardines y plantas ornamentales. ⁽⁸⁵⁾ En algunas partes del mundo se dan fenómenos de plagas de ciertos mamíferos como pueden ser los conejos en la zona oeste de los Estados Unidos. Y. Zewdie y P.W. Bosland estudiaron el efecto de los capsaicinoides frente al daño de conejos salvajes en las plantaciones de lechuga. Observaron que en plantaciones que había sido parte de las plantas tratadas con capsaicinoides, los conejos únicamente se comían aquellas plantas que no habían sido tratadas. ⁽⁸⁶⁾

2.5 Cromatografía

A principios del siglo XX el botánico-químico ruso Michael Tswett, vertió extracto de hojas vegetales en un tubo de ensayo que contenía carbonato cálcico pulverizado. Al añadir posteriormente disolvente, pudo comprobar que los pigmentos coloreados se separaban, de ahí el nombre “cromatos” (del griego, color) para una serie de técnicas que se engloban bajo la denominación genérica de cromatografía y que poseen características generales similares. ⁽⁸⁷⁾

La cromatografía es un procedimiento de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se

desplaza al contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello ocupa una posición dominante. Ningún laboratorio de análisis podría obviarla. ⁽⁸⁸⁾

La cromatografía es un procedimiento físico-químico de separación, de la misma importancia que la destilación, la cristalización o la extracción fraccionada, de constituyentes de una mezcla homogénea líquida o gaseosa. Se trata de un procedimiento de aplicación muy amplia, tanto es así que muchas mezclas heterogéneas o en forma sólida pueden transformarse en fase líquida por el empleo de un disolvente (este aparece como un compuesto suplementario de la mezcla analizada).

Además de esta forma de uso empleada desde su origen, la cromatografía se convirtió en un método de análisis cuando se tuvo la idea de instalar a la salida de la columna un dispositivo para monitorizar, en función del tiempo, un parámetro que permitiera localizar los cambios de composición de la fase móvil; de este modo podemos conocer el tiempo de migración de los compuestos. Esta forma de cromatografía, cuyo objetivo no es el de recuperar los compuestos, apareció en los años cuarenta. Su desarrollo ha sido relativamente lento. ⁽⁸⁸⁾

La identificación de un compuesto por cromatografía corresponde a un método comparativo. Si se dispone de un compuesto del que no se sabe si se trata de A o B, su identificación por el método cromatográfico consistirá en comparar su tiempo de migración con el correspondiente a dos compuestos de referencia A y B, y esto, sin cambiar de instrumentación y colocándolos en las mismas condiciones. ⁽⁸⁸⁾

Según la naturaleza de las dos fases se puede hablar de diversos tipos de cromatografía: cromatografía en papel, en capa fina, líquido-líquido, gaseosa, de filtración en gel, líquida de alta presión o *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*, de intercambio iónico, de afinidad, etc. ⁽⁸⁷⁾

2.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, *HPLC*, cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) es la más conocida. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito de la cromatografía de gases a la que se le añade el correspondiente al análisis de compuestos termosensibles o de aquellos con masas moleculares muy grandes o incluso polares.⁽⁸⁹⁾ Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria. La eficacia de las columnas es menor que en GC, pero la utilización de fases quirales o de nuevas fases estacionarias que actúan siguiendo varios mecanismos, las técnicas de intercambio de iones o las de interacción hidrófoba aumentan aún más las posibilidades de la *HPLC*. Por último, la miniaturización de la técnica (nanocromatografía) ha facilitado su asociación con la espectrometría de masas.⁽⁸⁸⁾

La cromatografía líquida de alta eficacia, constituye una técnica analítica de uso muy generalizado. Deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Estas fases, constituidas generalmente por micro partículas esféricas cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 5 μm , producen una pérdida de presión importante en la columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte presión a la fase móvil para obtener un caudal conveniente. Para destacar esta particularidad de la técnica, la letra P de las siglas *HPLC*, durante mucho tiempo, ha correspondido a la palabra presión. La migración forzada de una fase líquida al contacto de una fase estacionaria se encuentra en varias técnicas cromatográficas. La particularidad de la *HPLC* es que hace intervenir mecanismos de intercambio disolución/fase móvil fase estacionaria basados en los correspondientes coeficientes de reparto.⁽⁸⁸⁾

En este tipo de cromatografía, la fase móvil, bombeada a presión, fluye a través de la columna estrechamente empaquetada, lo que ocasiona tiempos de análisis muy

reducidos. Los eluatos se identifican cuando abandonan la columna por métodos como absorción UV, índice de refracción o medidas de fluorescencia. ⁽⁸⁷⁾

Las técnicas basadas en la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, proporcionan análisis muy eficientes y exactos sobre el contenido y el tipo de los capsaicinoides presentes en los pimientos picantes. Sin embargo, es necesario optimizar métodos para cada sistema cromatográfico que se emplee a fin de identificar cada uno de los capsaicinoides, estrechamente relacionados, presentes en los extractos.

Este tipo de cromatografía actualmente es, sin duda, la técnica analítica más habitual para la caracterización de capsaicinoides provenientes de pimientos o de otras matrices, tal como se puede comprobar en la extensa bibliografía existente con respecto a la identificación y análisis de estos compuestos. ⁽⁸⁷⁾⁽⁹⁰⁾

2.6 Extracción asistida por ultrasonido

Los métodos más usados para la extracción de Capsaicina son la hidrodestilación, la extracción con disolvente y la destilación-extracción simultáneas, aunque nuevos métodos se han venido desarrollando para recuperar los compuestos de interés, intentando no producir alteraciones de los mismos ni introducir contaminantes como es el caso de técnicas tales como la extracción con fluidos supercríticos, ultrasonido y el uso de microondas.

El sonido surge como resultado del recorrido de la energía mecánica a través de la materia, en forma de una onda que produce alternadamente los fenómenos de compresión y rarefacción. Las ondas de presión se propagan por el desplazamiento físico del material a través del cual el sonido está siendo transmitido. Como resultado de estos cambios en la presión, surge una onda sinusoidal (Figura N°9). Los cambios de la presión en función del tiempo constituyen las unidades básicas de medida del sonido. A la distancia entre puntos correspondientes de la curva tiempo-presión, se le conoce como longitud de onda, λ . Se llama periodo al tiempo T necesario para completar un ciclo. El número de ciclos completos por unidad de tiempo, es la frecuencia del sonido. La frecuencia y el periodo son inversamente proporcionales.

⁽⁹¹⁾

El sonido se transmite en forma de ondas de presión alternantes que provocan los fenómenos de compresión y rarefacción en el medio conductor. Las frecuencias altas se expresan en Kilohertzio (kHz; 1 kHz = 1.000 Hz) o megahertzio. El rango de frecuencias acústicas se encuentra entre menos de 1 Hz y más de 100.000 Hz (100 kHz). En el ser humano, la capacidad de audición se limita al área más baja de ese rango, oscilando entre 20Hz y 20.000 Hz. Los ultrasonidos se diferencian del sonido audible únicamente en la frecuencia, que es 500 a 1.000 veces mayor que la del sonido que normalmente oímos. ⁽⁹¹⁾

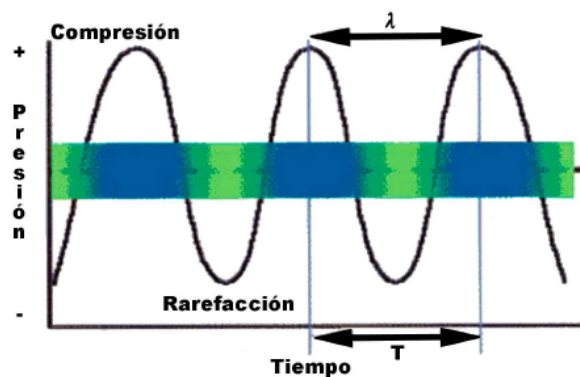


Figura N°9: Ondas Sonoras. ⁽⁹¹⁾

Su principal diferencia con las ondas electromagnéticas es que el ultrasonido requiere de un medio elástico para ser transmitido (sólido, líquido o gaseoso). La velocidad de propagación viene determinada, en gran medida, por la resistencia del medio a la compresión, que depende a su vez de la densidad, rigidez y elasticidad del medio. Así, la velocidad de propagación aumenta al hacerlo la rigidez y disminuye cuando aumenta la densidad. ⁽⁹²⁾

La extracción asistida por ultrasonido se basa en el empleo de la energía derivada de los ultrasonidos para facilitar la extracción, a partir de la muestra, de los analitos por el disolvente orgánico seleccionado en función de la naturaleza de los solutos a extraer. La aplicación de los ultrasonidos en un medio líquido provoca el fenómeno de la cavitación. Este proceso se divide en dos etapas:

Durante la primera fase, la depresión, se crea en el interior del líquido una infinidad de burbujas.

Durante la segunda fase, la compresión, la enorme presión ejercida sobre estos puntos hacen que estos se compriman hasta hacerlos colapsar en sí mismos (implosión) o simplemente acumular energía para volver a pasar a la primera fase, con el consiguiente desprendimiento de energía que a su vez imprime una velocidad o flujo dentro del fluido produciendo un movimiento de masa. La extracción se ve facilitada y acelerada gracias a esa energía. ⁽⁹²⁾

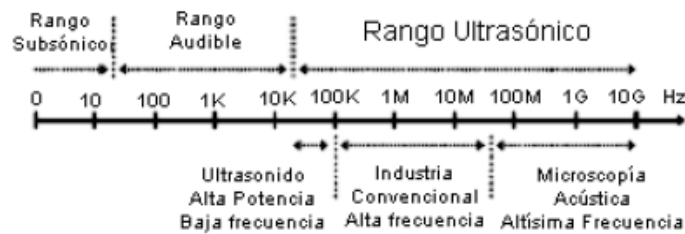


Figura N°10: Rangos de sonidos. ⁽⁵⁵⁾

Los efectos mecánicos y químicos de la cavitación son importantes y tienen un amplio rango de aplicaciones. Un ejemplo de las aplicaciones del ultrasonido es en la digestión enzimática de especies metálicas.

En una revisión realizada por Bermejo y colaboradores sobre el tema, se destaca el potencial de la aplicación de los ultrasonidos tanto por medio de una sonda ultrasónica como de baño de ultrasonidos para acelerar la digestión y extracción de estas especies. ⁽⁹³⁾

La extracción asistida por ultrasonidos es usada como un método simple y barato de extracción con disolventes líquidos aplicado a analitos en matrices sólidas como pueden ser las muestras de pimientos. La ventaja de la optimización de un procedimiento de extracción mediante el empleo de ultrasonidos es que se consiguen mejores eficiencias de extracción, con un mínimo consumo de disolventes y en tiempos inferiores a las técnicas de extracción convencionales, como puede ser la maceración. Esto es debido a que el área de la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida es mucho mayor. Todo ello conlleva a un ahorro de tiempo y de

disolvente, lo que se traduce en un menor consumo de dinero y en la conservación del medio ambiente. ⁽⁹⁴⁾

Tabla N° 9. Aplicaciones del ultrasonido

Efecto de la cavitación	Aplicación
En células vivas	- Estimulación de la actividad - Destrucción sonoquímica
En enzimas	- Estimulación de la actividad - Desnaturalización controlada
Superficie de compuestos	- Impregnación mejorada - Extracción mejorada

Las técnicas clásicas de extracción con disolventes de materiales de matrices vegetales se basan en la correcta selección del disolvente acoplado al uso de temperatura y/o de agitación. La extracción de los compuestos orgánicos que contiene la semilla o parte de la planta se ve significativamente mejorada con el uso de ultrasonidos. El efecto mecánico de los ultrasonidos proporciona una mayor penetración del disolvente en el material intracelular y mejora la transferencia de masas y tiene la ventaja añadida que resulta de la ruptura de las paredes de las células facilitando la liberación de los contenidos y consecuentemente mejorando la extracción. Por otro lado, el fenómeno de implosión se define como el instante en el cual la velocidad de la pared de la burbuja alcanza la velocidad del sonido en el líquido y forma así una discontinuidad. ⁽⁹⁵⁾

En el momento en que una cavidad completa su ciclo de vida, esta implota y libera energía. Gran parte de esta energía se convierte en un “jet” o chorro que actúa sobre cada una de las partículas de los líquidos inmiscibles que se encuentran alrededor o en una vecindad de la cavidad. Esto produce un flujo local que realiza un movimiento de partículas dentro del volumen y consecuentemente este flujo crea una microagitación que es superior a la producida por la tradicional agitación magnética. ⁽⁹⁶⁾

Los efectos combinados de la microagitación con la transferencia de masas mejorada dan como resultado un método de extracción más eficiente para la extracción de

compuestos naturales. Los resultados obtenidos con la extracción asistida por ultrasonido son similares a los de una extracción Soxhlet pero la duración no suele ser superior a los 30 minutos en la mayoría de los casos. En algunos casos, se han obtenido recuperaciones similares a las logradas con la extracción asistida por microondas. ⁽⁹⁵⁾

La aplicación de esta técnica a las plantas ha producido resultados muy interesantes, de hecho se ha propuesto extenderla al procesado industrial para obtener compuestos con propiedades farmacológicas. ⁽⁹⁶⁾

Esta técnica se ha empleado con gran éxito para extraer distintos compuestos orgánicos de distintas matrices como hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos ⁽⁹⁷⁾, compuestos fenólicos en cremas ⁽⁹⁸⁾, pesticidas clorados en hígados de pájaros ⁽⁹⁹⁾, nicotina en medicamentos ⁽¹⁰⁰⁾, ácidos orgánicos en uvas, compuestos fenólicos en fresas, isoflavonas en soja, etc. ⁽¹⁰¹⁾

Los ultrasonidos también han sido empleados como una herramienta para la extracción de capsaicinoides en pimientos. Varios autores han aplicado esta técnica de extracción a la hora de analizar los capsaicinoides presentes en los pimientos.

Karnka y colaboradores, optimizaron la extracción de capsaicinoides en muestras de pimientos picantes mediante ultrasonidos. Optimizaron el tiempo de extracción, así como el volumen de disolvente a utilizar. Para ello utilizaron cantidades de muestras de 0,3 gramos y las sometieron a ultrasonidos con volúmenes de 10, 15, 20, 30 y 40 mL de acetonitrilo durante 60 minutos. También con la misma cantidad de muestra, se realizaron extracciones con 10 mL de acetonitrilo durante 10, 30, 45, 60, 75 y 105 minutos. Como resultado del trabajo, se obtuvo que las mejores condiciones de extracción fueron 60 minutos usando como volumen de disolvente 10 mL. Ningún otro parámetro fue estudiado. ⁽¹⁰²⁾

Daood y colaboradores realizaron la determinación de capsaicinoides en pimiento paprika picante (*Capsicum annuum L*) mediante extracci3n con ultrasonidos en comparaci3n con la extracci3n mediante fluidos supercríticos. Para ello tomaban 1 gramo de pimiento y lo extraían con 10 mL de metanol en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. ⁽¹⁰³⁾

Esta técnica ha sido poco estudiada para la extracción de los capsaicinoides. Sin embargo esta técnica se ha estudiado con éxito en la extracción de un gran número de compuestos naturales procedentes de plantas y alimentos como pueden ser compuestos fenólicos en fresas ⁽¹⁰¹⁾, isoflavonas en soja ⁽¹⁰⁴⁾, azúcares en manzanas ⁽¹⁰⁵⁾, ácidos orgánicos en uvas, etc. ⁽¹⁰⁶⁾

Solamente hay algunas aplicaciones puntuales de la extracción asistida por ultrasonido para la extracción de los capsaicinoides en pimientos picantes, no habiéndose estudiado en profundidad esta técnica para estos compuestos. ⁽¹⁰²⁾

En cuanto a la extracción de capsaicinoides en pimientos han sido muchos los métodos desarrollados. Las extracciones son llevadas a cabo empleando disolventes orgánicos como o bien mezcla de estos. En la tabla N° 10 se muestra una compilación de autores que describen extracción de capsaicinoides con diferentes solventes.

No existe un protocolo definido, ni estudios exhaustivos acerca del efecto de los ultrasonidos en la extracción de esta familia de compuestos. Por todo ello se hace necesario evaluar los distintos parámetros que pueden influir en la extracción de los capsaicinoides mediante el empleo de esta técnica, como pueden ser el disolvente, el tiempo de extracción, la temperatura, la cantidad de muestra o el volumen de disolvente a emplear.

Tabla N° 10. Diferentes solventes empleados para la extracción de Capsaicina.

Solvente	Referencia	Año
Metanol	R. Karnka, ⁽¹⁰²⁾	2002
	P. Kirschbaum-Ti ⁽⁵²⁾	2002
Etanol	G.F Barbero ⁽¹⁰⁷⁾	2006
	R.I Santamaria ⁽¹⁰⁸⁾	2000
Acetonitrilo	B. Estrada ⁽⁵⁰⁾	2000
	B. Estrada ⁽⁵⁶⁾	1999
	M. Contreras-Padilla ⁽⁴⁶⁾	2005
	R. Karnka ⁽¹⁰²⁾	2002
Acetona	R. Karnka ⁽¹⁰²⁾	2002
Acetato de etilo	K. Iwai ⁽²⁶⁾	1998
Mezcla acetona- éter etílico	I. Perucka ⁽¹⁹⁾	2000

2.7 Perspectivas futuras

La Capsaicina con alto grado de pureza tiene un alto precio en el mercado de reactivos, por lo que la determinación de regiones de cultivo con altas concentraciones en el *Capsicum pubescens* sería una alternativa para que se trabajara en el aislamiento y purificación del metabolito mencionado, con beneficios económicos para el Perú.

Es necesario el aporte de información científica sobre plantas medicinales en el Perú, para, bajo conocimientos científicos establecidos, entender su mecanismo de acción y poder así promover el desarrollo a nivel industrial de las mismas.

El presente trabajo se centra en el análisis de los compuestos de *Capsicum pubescens*, en especial Capsaicina que al ser cuantificada poder difundir y promover este fruto como una fuente rica en este compuesto, teniendo como visión futura el desarrollo y validación de ingredientes funcionales para su aplicación en la industria agroalimentaria y /o farmacéutica.

En el ámbito mundial, cada día se estudian los beneficios que ofrece el género *Capsicum* en la industria de alimentos, la farmacología y la medicina humana. Desafortunadamente las especies cultivadas de *Capsicum* de Arequipa, por no haber sido estudiadas no aparecen entre las especies de importancia económica para la diversificación de la agricultura, mucho menos para promover la agroindustria nacional. Su consumo como hortaliza fresca entre los vegetarianos se ha incrementado, especialmente por proveer antioxidantes a la dieta. Se espera de este trabajo el poder cumplir los objetivos y poder promover valor la diversidad biológica vegetal del Perú y demostrar el potencial nutricional, farmacológico e industrial del rocoto y promoverlo para la producción empresarial a gran escala de subproductos.

Se espera que esta investigación sea el punto de partida en los procesos de selección, análisis ,diseño y mejora de bioprocesos, para la obtención de nuevos productos, y vías alternativas de producción de compuestos orgánicos de interés industrial teniendo como materia prima el rocoto; pudiendo derivar y producir productos tales como: complejos alimenticios, salsas aditivas picantes, vitaminas, sprays de defensa, fármacos, cosméticos, sustratos seleccionados en compuestos bioquímicos de alto valor añadido, etc.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Campo de Investigación

3.1.1 Ámbito Geográfico

El presente trabajo se realizó en el laboratorio H-101 del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa-Perú.

La determinación y cuantificación de Capsaicina se realizó en el laboratorio de Control de Calidad H-204 de la Universidad Católica de Santa María también en Arequipa-Perú.

3.1.2 Estrategia de recolección de datos

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizaron muestras de rocoto provenientes de la estación experimental INIA, de la Ciudad de Arequipa Perú.

Tabla N° 11. Datos de localización de la estación experimental INIA

Estación experimental INIA Arequipa	
PNI	Recursos Genéticos
Oficina	Conservación de recursos genéticos
Localización	Santa Rita
Región	Arequipa
Provincia	Arequipa
Distrito	Santa Rita de Sigwas
Campo experimental	Santa Rita
Propietario	INIA
Altitud	1,280 m.s.n.m.
Latitud	70° 07'00"
Longitud	16° 28'00"

3.1.3 Unidades de Estudio

Las unidades de estudio para este trabajo fueron las 7 variedades promisoramente seleccionadas del Instituto Nacional de Innovación Agraria oriundo de la localidad de Arequipa, Perú

3.2 Materiales

3.2.1 Material vegetal

Muestras de 7 variedades diferentes de *Capsicum pubescens* provenientes de la estación experimental INIA, de la Ciudad de Arequipa Perú.

3.2.2 Reactivos Químicos

- Acetonitrilo grado *HPLC* (Merck)
- Metanol grado *HPLC* (Merck)
- Etanol grado *HPLC* (Merck)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Agua ultra pura
- Agua destilada
- Patrón de Capsaicina (Sigma-Aldrich)

Tabla N° 12. Datos de calidad de solventes y patrón

Nombre	Formula	cas	Calidad
Metanol	CH ₃ OH	404-86-4	≥99% <i>HPLC</i>
Etanol	C ₂ H ₆ O	64-17-5	95%
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	75-05-8	≥99% <i>HPLC</i>
Patrón Capsaicina	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	404-86-4+	≥99% <i>HPLC</i>

3.2.3 Material de vidrio

- Tubos de ensayo Pyrex con tapadera 20mL
- Baguetas
- Fiolas de 5 mL
- Fiolas de 10 mL

- Pipetas de 1,2,5 y10 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Vasos de precipitados de 10 y 100 mL
- Probeta de 500 mL
- Viales de 2 mL para *HPLC*

3.2.4 Material convencional

- Columna LiChroCART® RP-18(5 µm)
- Filtros de jeringa de 0.45 µm estériles Macherey-Nagel
- Filtros de membrana 0.2µmesteriles Merck
- Espátula pequeña
- Filtro de agua ultra pura
- Jeringas de 10 mL
- gradillas
- Papel Filtro Sartorius Whatman No. 40 Cualitativo
- Mascara de protección contra gases marca 3M
- Gorro de protección
- Guantes

3.2.5 Equipos

- Balanza electrónica Ohaus Scout-pro sp202
- Balanza Ohaus Scout-pro
- Equipo de Ultrasonido , Sonicador JP SelectaCat3000683
- Licuadora marca Oster modelo BLST-W00-051 A 60HZ
- Bomba al vacío Cole Parmer 7049-02
- Cromatógrafo liquido de alta performance (*HPLC*) Merck Elite Lachrome con los siguientes modulos:
 - Organizador, Modelo L-2000; Serie 17E16-04
 - Detector de Arreglo de Diodos, Modelo L-2450; Serie 1726-001
 - Bomba, Modelo L-210; Serie 17E01-06
 - Horno, Modelo L-2350; Serie 17E015-04
 - Software: EZChrome Elite

- Descriptor para *Capsicum* spp. Establecido por el International Plant Genetic Resources Institute.

3.3 Métodos

3.3.1 Recolección de la muestra

El Instituto Nacional de Innovación Agraria, INIA por sus iniciales, es un organismo público adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego, responsable de diseñar y ejecutar la estrategia nacional de innovación agraria. El INIA es autoridad técnico normativa en materia de semillas, seguridad de la biotecnología moderna, registro nacional de papa nativa peruana, camélidos sudamericanos domésticos, entre otros del Perú. ⁽¹²⁹⁾

Actualmente el INIA en La Estación Experimental Agraria Arequipa viene trabajando desde el 2011 el proyecto “Análisis de la Diversidad y Conservación de Germoplasma de la colección Nacional de “Rocotos”, *Capsicum pubescens*” trabajo en el cual finalmente en enero del 2013 se seleccionó 7 variedades óptimas para la conservación de germoplasma de *Capsicum pubescens*. ⁽¹²⁹⁾

Es de esta manera que las muestras fueron recolectadas manualmente en los cultivares del Instituto de Innovación Agraria INIA. Cada muestra consistió en aproximadamente un kilogramo de frutos de *Capsicum pubescens* de cada accesión, estas muestras fueron escogidos por el método de recolección y muestreo de espiga o Zigzag. Obteniendo así un total de 7 muestras representativas de cada accesión. Se les pesó y los frutos de rocoto fueron empacados en bolsas plásticas con cierre hermético hasta su llegada al laboratorio, donde se guardaron en refrigeración hasta el momento de su análisis.

A. Condiciones de siembra

Se averiguó también las condiciones de siembra ya que las 7 variedades de rocoto fueron cultivadas bajo los mismos parámetros como características del suelo las cuales incluyen: topografía del suelo, pH, porcentaje de arena, porcentaje de carbonatos (CO_3^-), porcentaje de arcilla, porcentaje de limo, partes por millón de óxido de fosforo (P_2O_5) y partes por millón de óxido de potasio (K_2O) y porcentaje

de nitrógeno, así como condiciones de clima, diseño experimental, control de malezas y la frecuencia y medio de riego.

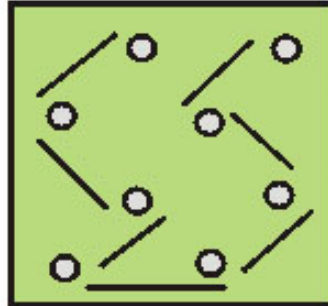


Figura N°11. Representación gráfica de la toma de muestras de Instituto de Innovación Agraria INIA, Estación Experimental de Santa Rita de Siguas.

B. Identificación y caracterización de la especie vegetal. Componentes de estudio IPGRI

El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI por sus siglas en inglés *International Plant Genetic Resources Institute*) es una organización científica, autónoma, de carácter internacional que funciona bajo los auspicios del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GICAI) y opera de la mano de la Organización Mundial de las Naciones Unidas para el desarrollo de la Agricultura. Sus actividades incluyen la recolección de germoplasma, su conservación y desarrollo; el mejoramiento varietal; el desarrollo de mejores tecnologías de producción; estudios nutricionales y ambientales; transferencia de tecnologías; capacitación de personal de los programas nacionales y publicación de tecnologías de investigación. Así como también es el ente encargado de la publicación de descriptores internacionales de identificación para los diferentes cultivos de plantas a nivel internacional. ⁽⁹⁾

Posterior a la recolección de las muestras, se realizó el reconocimiento de la especie vegetal mediante evaluación y caracterización frente a diferentes características utilizando el descriptor IPGRI para el género *Capsicum* spp.

Los parámetros a evaluar contaban con diferente numeración para cada característica observada para los cuales se observaron los siguientes parámetros anotando cada una de las opciones que presentaron.

Parte vegetativa

- a) Plántula (Registrar los datos cuando el brote terminal tiene de 1 a 2 mm de tamaño) Color del hipocotíleo
Opciones: 1 Blanco, 2 Verde, 3 Morado
- b) Pubescencia del hipocotíleo
Opciones: 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Densa
- c) Color de la hoja cotiledónea
Opciones: 1 Verde claro, 2 Verde, 3 Verde oscuro, 4 Morado claro, 5 Morado, 6 Morado oscuro, 7 Jaspeado (abigarrado), 8 Amarillo, 9 Otro
- d) Forma de la hoja cotiledónea
Opciones: 1 Deltoide, 2 Oval, 3 Lanceolada, 4 Elongada- deltoide
- e) Longitud de la hoja cotiledónea [mm]. Medir la longitud cuando las hojas cotiledóneas estén completamente desarrolladas. Promedio de 10 hojas cotiledóneas.
- f) Ancho de la hoja cotiledónea [mm]. Medir la longitud cuando las hojas cotiledóneas estén completamente desarrolladas. Promedio de 10 hojas cotiledóneas

Datos de la planta

- g) Ciclo de vida
Opciones: 1 Anual, 2 Bianual, 3 Perenne
- h) Color del tallo. Se registra en las plantas jóvenes antes del trasplante.
Opciones: 1 Verde, 2 Verde con rayas púrpura. 3 Morado, 4 Otro
- i) Antocianina del nudo (toda la planta). Se observa cuando la planta está madura
Opciones: 1 Verde, 3 Morado claro, 5 Morado, 7 Morado oscuro
- j) Forma del tallo. Se observa cuando la planta está madura
Opciones: 1 Cilíndrico, 2 Angular, 3 Achatado (aplastado)
- k) Pubescencia del tallo. Se observa en las plantas maduras, excluyendo los primeros dos nudos debajo del brote.

Opciones: 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Densa

- l) Altura de la planta [cm]. Se registra cuando comienza a madurar el primer fruto en el 50% de las plantas

Opciones: 1 cuando <25, 2 entre 25-45, 3 entre 46-65, 4 entre 66-85, 5 cuando >85

- m) Hábito de crecimiento de la planta. Observado cuando ha comenzado a madurar el primer fruto en el 50% de las plantas.

Opciones: 3 Postrada, 5 Intermedia (compacta), 7 Erecta, 9 Otro

- n) Ancho de la planta [cm]. Se mide inmediatamente después de la primer cosecha, en el punto más ancho

- o) Longitud del tallo [cm]. Se mide la altura hasta la primer bifurcación, inmediatamente después de la primer cosecha

- p) Diámetro del tallo [cm]. Se mide en la parte del medio hasta la primer bifurcación, inmediatamente después de la primer cosecha

- q) Densidad de ramificación

Opciones: 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Densa

- r) Macollamiento. Se observa debajo de la primer bifurcación

Opciones: 3 Escaso, 5 Intermedio, 7 Denso

- s) Densidad de hojas. Se observa en plantas sanas y maduras. Promedio de 10 plantas

Opciones: 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Densa

- t) Color de la hoja

Opciones: 1 Amarillo, 2 Verde claro, 3 Verde, 4 Verde oscuro, 5 Morado claro, 6 Morado, 7 Jaspeado (abigarrado), 8 Otro

- u) Forma de la hoja

Opciones: 1 Deltoide, 2 Oval, 3 Lanceolada

- v) Margen de la lámina foliar

Opciones: 1 Entera, 2 Ondulada, 3 Ciliada

- w) Pubescencia de la hoja. Se observa en las hojas maduras más jóvenes.

Opciones: 3 Escasa, 5 Intermedia, 7 Densa

- x) Longitud de la hoja madura [cm]

- y) Ancho de la hoja madura [cm]. Se mide en la parte más ancha de la hoja

Inflorescencia

Inflorescencia. Datos registrados en flores totalmente abiertas durante el primer flujo de floración

- a) Días a la floración. Número de días desde la siembra hasta que el 50% de las plantas tienen por lo menos una flor abierta.
- b) Número de flores por axila
Opciones: 1 Uno, 2 Dos, 3 Tres o más, 4 Muchas flores en racimo, pero cada una en axila individual (crecimiento fasciculado), 5 Otro (es decir, cultivares con dos flores en la primer axila y con una solamente en la otra)
- c) Posición de la flor. Se observa a la antesis.
Opciones: 3 Pendiente, 5 Intermedia, 7 Erecta
- d) Color de la corola
Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo claro, 3 Amarillo, 4 Amarillo-verdoso, 5 Morado con la base blanca, 6 Blanco con la base púrpura, 7 Blanco con el margen púrpura, 8 Morado, 9 Otro
- e) Color de la mancha de la corola
Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo, 3 Verde-amarillento, 4 Verde, 5 Morado, 6 Otro
- f) Forma de la corola
Opciones: 1 Redonda, 2 Acampanulada, 3 Otro
- g) Longitud de la corola [cm]. Promedio de 10 pétalos de corola diseccionada
Opciones: 1 cuando <1.5 , 2 entre $1.5-2.5$, 3 cuando >2.5
- h) Color de las anteras. Se observa inmediatamente después de la floración y en el momento de la antesis.
Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo, 3 Azul pálido, 4 Azul, 5 Morado, 6 Otro
- i) Longitud de la antera [mm]. Promedio de 10 flores seleccionadas de 10 plantas. Observadas inmediatamente en el momento de la antesis
- j) Color del filamento. Se observa inmediatamente cuando la antesis está completa
Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo, 3 Verde, 4 Azul, 5 Morado claro, 6 Morado, 7 Otro

- k) Longitud del filamento [mm]. Promedio de 10 flores seleccionadas de 10 plantas. Se observa inmediatamente a la antesis.
- l) Exserción del estigma. Exserción con relación a las anteras, Promedio de 10 flores seleccionadas de 10 plantas. Se observa a la antesis completa.
Opciones: 3 Inserto, 5 Al mismo nivel, 7 Exserto,
- m) Esterilidad masculina
Opciones: 0 No, 1 Si
- n) Pigmentación del cáliz
Opciones: 0 Ausente, 1 Presente
- o) Margen del cáliz
Opciones: 1 Entero (liso), 2 Intermedio, 3 Dentado, 4 Otro
- p) Constricción anular del cáliz. En la unión del cáliz con el pedicelo. Se observa cuando su estado es maduro.
Opciones: 0 Ausente, 1 Presente

Fruto

Los datos se registran en frutos maduros (a la primera cosecha), a menos que se especifique lo contrario

- a) Días a la fructificación. Número de días desde el trasplante hasta que el 50% de las plantas tienen frutos en la primera y segunda bifurcaciones.
- b) Manchas o rayas antocianínicas. Se observa en frutos inmaduros justo antes de la madurez
Opciones: 0 Ausente, 1 Presente
- c) Color del fruto en el estado intermedio. Se observa justo antes de la madurez.
Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo, 3 Verde, 4 Anaranjado, 5 Morado, 6 Morado oscuro, 7 Otro
- d) Cuajado del fruto. Se registra antes de la cosecha.
Opciones: 3 Bajo, 5 Intermedio, 7 Alto
- e) Período de fructificación. Número de días desde el primer cuajado del fruto hasta la última formación del fruto.
- f) Color del fruto en estado maduro

Opciones: 1 Blanco, 2 Amarillo-limón, 3 Amarillo-naranja pálido, 4 Amarillo-naranja, 5 Naranja pálido, 6 Naranja, 7 Rojo claro, 8 Rojo, 9 Rojo oscuro, 10 Morado, 11 Marrón, 12 Negro, 13 Otro

g) Forma del fruto

Opciones: 1 Elongado, 2 Casi redondo, 3 Triangular, 4 Acampanulado, 5 Acampanulado y en bloque, 6 Otro

h) Longitud del fruto [cm] Promedio de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.

i) Ancho del fruto [cm] Promedio de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.

j) Peso del fruto [g] Promedio del peso de 10 frutos maduros de la segunda cosecha.

k) Longitud del pedicelo del fruto [cm] Promedio de la longitud de 10 pedicelos de la segunda cosecha medida hasta un lugar decimal

l) Espesor de la pared del fruto (pdf) [mm] Promedio del espesor de 10 frutos maduros de la segunda cosecha, medido en el punto más ancho hasta un lugar decimal

m) Forma del fruto en la unión con el pedicelo.

Opciones: 1 Agudo, 2 Obtuso, 3 Truncado, 4 Cordado, 5 Lobulado

n) Cuello en la base del fruto

Opciones: 0 Ausente, 1 Presente

o) Forma del ápice del fruto. Promedio de 10 frutos.

Opciones: 1 Puntudo, 2 Romo, 3 Hundido, 4 Hundido y puntudo, 5 Otro

p) Apéndice en el fruto, vestigio de la floración

Opciones: 0 Ausente, 1 Presente

q) Arrugamiento transversal del fruto. Promedio de 10 frutos, (1/3 desde el final del pedicelo).

Opciones: 3 Levemente corrugado, 5 Intermedio, 7 Muy corrugado

r) Número de lóculos. Observar 10 frutos, si el número de lóculos (cámara) es uniforme, regístrelo; si no, registre los dos números más frecuentes (o el porcentaje de todas las categorías)

s) Tipo de epidermis del fruto

Opciones: 1 Lisa, 2 Semirrugosa, 3 Rugosa

- t) Persistencia del fruto maduro. Pedicelo con el fruto
Opciones: 3 Fácil (leve), 5 Intermedia, 7 Persistente
- u) Persistencia Pedicelo con el tallo
Opciones: 3 Fácil (leve), 5 Intermedia, 7 Persistente
- v) Longitud de la placenta
Opciones: 1 $<1/4$ longitud del fruto, 2 $1/4-1/2$ longitud del fruto, 3 $>1/2$ longitud del fruto
- w) Condición de mezcla varietal
Opciones: 3 Mezcla leve, 5 Mezcla intermedia, 7 Mezcla importante

Semilla

- a) Color de la semilla
Opciones: 1 Amarillo oscuro (paja), 2 Marrón, 3 Negro, 4 Otro
- b) Superficie de la semilla
Opciones: 1 Lisa, 2 Áspera, 3 Rugosa
- c) Tamaño de la semilla. Promedio de 10 semillas escogidas al azar.
Opciones: 3 Pequeña, 5 Intermedia, 7 Grande
- d) Diámetro de la semilla [mm], Diámetro máximo de 10 semillas hasta dos lugares decimales
- e) Peso de 1000 semillas [g]
- f) Número de semillas por fruto. Promedio de por lo menos 10 frutos por variedad escogidos al azar
Opciones: 1 cuando <20 , 2 cuando $20-50$, 3 cuando >50
- g) Número promedio de semillas en cada fruto.

3.3.2 Método de extracción

A. Preparación de las Muestras

Se homogenizó cada muestra de cada una de las siete variedades de rocoto mediante el licuado de estas de las muestras; teniendo por separado 2 formas de muestra para cada accesión, muestra de pulpa pura de rocoto y muestra de semillas de rocoto.

Para esta homogenización se utilizó los rocotos de cada accesión, se les corto y se les sacó las semillas; se introdujo toda la carne del fruto a la Licuadora marca Oster

modelo BLST-W00-051 A 60HZ, sin agregar líquido alguno por un periodo aproximado de 5-10 minutos a temperatura ambiente.

De igual forma se procedió a homogenizar las semillas de rocoto sin líquido ni pulpa alguna por un periodo de 5-15 minutos a temperatura ambiente parando cada minuto para evita que el calor de la fricción de las cuchillas altere el contenido de Capsaicina en las muestras.

B. Extracción de Capsaicina

Para la extracción de Capsaicina se pesó en una balanza electrónica scout pro ohaus sp 202, un tubo de ensayo con rosca, se taró la balanza y se agregó exactamente 1.00 g de muestra; posteriormente se añadió 5,10 o 20 mL de diversos solventes, en este caso se empleó metanol, etanol y acetonitrilo.

Estos tubos fueron colocados en el equipo de extracción asistida por ultrasonido a diferentes tiempos y temperaturas de extracción.

C. Determinación de parámetros de extracción

Para la determinación de las condiciones óptimas para extracción asistida por ultrasonido se efectuaron pruebas piloto realizadas por triplicado, se modificó diferentes variables y analizando sus resultados mediante cromatografía líquida de alta performance- *HPLC*.

Los diferentes parámetros evaluados en las pruebas piloto a diferentes condiciones fueron temperatura, tiempo y relación analito: solvente.

3.3.3 HPLC

3.3.3.1 Desarrollo patrones cromatográficos

A. Preparación de Solución Stock

Se pesó 10.00 mg patrón de Capsaicina (Sigma-Aldrich) en balanza analítica; luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 1000 ppm.

B. Preparación de Estándares

A partir de la solución Stock se realizó las diluciones pertinentes para obtener soluciones más diluidas, siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

Se tomó una alícuota de 2 ml luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 200 ppm. De esta se tomó una nueva alícuota de 5 mL luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 100 ppm. Nuevamente se tomó una nueva alícuota de 5 mL luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 50 ppm. De esta última se tomó una nueva alícuota de 5 mL luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 25 ppm. Finalmente se tomó una nueva alícuota de 5 mL luego se llevó a una fiola de 10 mL y se enrazó con metanol teniendo una concentración final de 12.5 ppm.

C. Preparación de fase móvil y desgasificación

Para la preparación de la fase móvil se tomó con una pipeta 2 mL de ácido acético glacial y se dispuso en un matraz de un litro, luego se enrazó con agua destilada ultra pura hasta volumen de un litro. Se armó un equipo convencional de sistema de vacío para solventes de *HPLC*. Se usó como filtro, un filtro de membrana de 0.2 μ m estéril. Se introdujo en el vaso una pequeña proporción y se cebó tanto como el matraz kitosato como el recipiente a contener finalmente el solvente. Luego se filtró toda el agua destilada ultra pura. Se llevó a la botella de solvente para *HPLC* y esta se conectó a la bomba del equipo. El metanol $\geq 99\%$ *HPLC* se filtró por el mismo equipo con un nuevo filtro de membrana de 0.2 μ estéril, se cebó tanto como el matraz kitosato como el recipiente a contener finalmente el solvente. Luego se filtró todo el metanol $\geq 99\%$ *HPLC*. Se llevó a la botella de solvente para *HPLC* y esta se conectó a la bomba del equipo.

D. Preparación de equipo *HPLC*

Para la preparación del Equipo primero se prendió el computador. Se abrió el programa Software EZChrome Elite en forma on line. Seguidamente se prendió el

equipo en el siguiente orden Organizador, Modelo L-2000 Serie 17E16-04; Detector de Arreglo de Diodos, Modelo L-2450 Serie 1726-001; Bomba, Modelo L-210 Serie 17E01-06 y finalmente el Horno, Modelo L-210 Serie 17E01-06.



Figura N°12. Esquema de equipo de filtración

El vaso superior está separado por una membrana de 0.2 μm .

E. Operaciones de inicio del equipo de *HPLC*.

Para la purga de canales: Se desajusto la válvula de purgado girando la válvula en sentido contrario a las manecillas del reloj. Se fué al menú control, opción instrument status, pestaña pump y se realizó un click en purge. Se seleccionó el canal (A-B-C-D respectivamente), se realizó un click en el botón denominado purge on, y de esta manera se inició el purgado, este se realizó por un periodo de 10 minutos como mínimo por canal. Transcurridos 10 minutos se presionó purge off y se cerró la ventana haciendo click en close.

Para la purga de aguja: Para la purga de la aguja se fué al menú control, opción instrument status, se ubicó en la pestaña de nombre sampler, se realizó un click en purge position. Se llegó al menú control, opción instrument status, se ubicó en la pestaña pump, se hizo click en purge. Se seleccionó el canal, se hizo click en el botón purge on, dando inicio al purgado, el purgado fue realizado por un periodo de 5

minutos como mínimo por canal. Transcurrido el tiempo necesario se presionó purge off, se cerró la ventana haciendo click en close.

Para la purga de jeringa: Se fue al menú control, opción instrument status, se ubicó en la pestaña de nombre sampler, se realizó un click sobre syringepure/plungerwash y apareció una venta donde se hizo click en ok. Se fué al menú control, opción instrument status, se ubicó en la pestaña PUMP, se hizo click en purge.

Se seleccionó el canal, se hizo click en purge on, dando inicio al purgado, el purgado fue realizado 10 minutos como mínimo por canal. Transcurrido el tiempo necesario se presionó purge off y se cerró la ventana haciendo click en close.

Para el lavado del Sistema: Se fué a menú control opción instrument status, se ubicó en la pestaña de nombre pump, se hizo click sobre manual set y se ingresó las condiciones cromatográficas de flujo y proporción de solventes que se desearon para el lavado. Se fue a la pestaña de DAD. Se apagó las lámparas en caso estas estuvieran encendidas haciendo click sobre los botones de d2 lamp off. El lavado se realizó con agua ultra pura desgasificada por lo menos 30 minutos y luego 30 minutos con solvente orgánico (metanol a flujo de 1 mL /min).

F. Determinación de longitud de onda

Se utilizó el equipo de *HPLC* para determinar la longitud de onda a la cual el estándar presenta mayor absorción.

Para esto se corrió la muestra de concentración de 50 ppm por el equipo de *HPLC*, se corrió la muestra haciendo clic en set up, análisis, se hizo clic en la opción axis properties, luego se escogió la opción 'left Y axis y debajo de esta opción se eligió los rangos ente 200 y 300 nm, dela misma manera se eligió valores entre 100 y 300 nm para la opción de right Y axis. Despues de poner los parámetros a trabajar se observó el cromatograma pudiendo determinar de esta forma la mejor longitud de onda.

G. Estandarización del método

Cada uno de los estándares fue filtrado con filtros de jeringa de 0.45 μm estériles de marca Macherey- Nagel, acoplados a jeringas de 10 mL para eliminar las partículas

pequeñas en la solución. Se tomó una alícuota de 2 mL y se llevó a viales para *HPLC* de 2 mL. Se tapó estos viales y se colocaron el automuestrador.

Habiendo ya acondicionado la columna con la fase móvil se inyectó 20 μ L de cada uno de los estándares a un flujo de 1 mL/Min. La detección de la Capsaicina se realizó a 280 nm de longitud de onda. Posterior a este procedimiento se construyó la curva de calibración correspondiente con los valores de área de pico presente en el cromatograma obtenido, sometiendo estos valores a un análisis de regresión lineal. Seguidamente se determinó parámetros de linealidad, sensibilidad y precisión.

Finalmente se abrió el icono de wizard del instrumento y se creó un método nuevo denominado Capsaicina. Teniendo así las referencias de las condiciones óptimas del método para las mediciones de las muestras posteriores.

3.3.4 Cuantificación de Muestras

Posterior a la extracción asistida por ultrasonido se filtró cada una de las muestras con filtros de jeringa de 0.45 μ m estériles de marca Macherey-Nagel, acoplados a jeringas de 10 mL para eliminar las partículas pequeñas en la solución. Del extracto se tomó con jeringa de 10 mL una alícuota de 2 mL y se llevó a viales para *HPLC* de 2 mL.

Se tapó estos viales y se colocaron el automuestrador. Se cargó el método de determinación y cuantificación de Capsaicina creado previamente y se corrieron las muestras en el equipo de *HPLC* para su análisis.

3.3.5 Métodos estadísticos

Frente a los resultados obtenidos en laboratorio para la determinación del método, estos fueron sometidos a análisis de dispersión como son la desviación estándar (S), la desviación estándar relativa (RSD) además de las pruebas de significación como análisis de varianza ANOVA.

CAPITULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo de métodos

Después de exponer el capítulo III correspondiente a Materiales y Métodos, procedemos a desarrollar los métodos correspondientes al trabajo “Extracción y cuantificación de Capsaicina de siete variedades de *Capsicum pubescens* “Rocoto” nativas de Arequipa” pudiendo analizar sus resultados.

4.1.1 Recolección de la muestra

Se envió una carta de presentación al Instituto de Innovación Agraria INIA solicitando se brindaran facilidades para la toma de muestra de las 7 variedades promisorias del Programa Nacional de Innovación Agraria de Recursos Genéticos y Biotecnología; teniendo respuesta positiva a esta solicitud. Se realizó un viaje para la recolección de muestras a la estación experimental de Santa Rita de Sigwas localizado en la región de Arequipa, distrito de Santa Rita de Sigwas. Esta estación está localizada a una de altitud 1.280 m.s.n.m, con coordenadas longitud $16^{\circ} 28'00''$, latitud $70^{\circ} 07'00''$.

Las muestras de los frutos de rocoto fueron empacadas en bolsas plásticas con cierre hermético hasta su llegada al laboratorio, donde se guardaron en refrigeración hasta el momento de su análisis.

A. Condiciones de siembra

Estudios sobre capsaicinoides han demostrado que el contenido en capsaicinoides está genéticamente controlado, pero también se ve afectado por variables medio ambientales, como la temperatura, la luz, la humedad del suelo o los niveles de fertilización de éste. ^{(55) (56) (109) (57)}

Es por esta razón la cual se optó por analizar muestras en las que no existieron mayores variables y que tuvieran las mismas condiciones de siembra para que al momento de analizar el contenido y porcentaje de Capsaicina por accesión, sería representativo solamente de cada variedad de cultivo.



Figura N°13. Vista Satelital del Instituto de Innovación Agraria INIA, Estación Experimental de Santa Rita, Arequipa.

Las condiciones de siembra en lo que a topografía del suelo refiere de las siete variedades de rocoto son reportadas en la Tabla N° 13.

Las condiciones de clima de la estación experimental del INIA sede Santa Rita de Siguanaba en la ciudad de Arequipa, se encuentra dentro de la zona agroecológica costa templada cálida, cuyos registros climáticos presentan para el año 2013 desde enero a diciembre temperaturas mínimas de 5 °C, temperatura media anual de 15.70 °C y máxima de 26 °C, humedad relativa ambiental máxima de 50%, mínima de 10.5% y media de 30.25%, evaporación promedio de 8.0 mm y precipitación de 1.7 mm/año.

En cuanto al diseño experimental, las variedades (unidades experimentales) estuvieron distribuidas de forma sistemática formando bloques de 40 variedades, cada unidad experimental estuvo constituida por 05 plantas con distanciamiento de 1.50 m entre variedad y entre planta 1.50 m. El control de malezas, fue realizado manualmente con obreros de campo y permanente.

La frecuencia y medio de riego: al cultivo de rocoto en la estación experimental de Santa Rita de Siguan, en Arequipa fue aplicada por medio del sistema de riego por goteo, el agua se aplicó con frecuencia de 1 h/día de acuerdo a la evapotranspiración anual.

Tabla N° 13. Características de Suelo

Características De Suelo	
topografía de suelo	plana con 0% de pendiente, de textura franco arenoso
pH	7.65
Arena	88.88%
CO ₃ (%)	4.35
Arcilla	3.84%
Limo	7.28%
P ₂ O ₅	4.97 ppm
K ₂ O	400 ppm
Nitrógeno (%)	0.05

Carbonatos (CO₃⁻), de óxido de fósforo (P₂O₅) óxido de potasio (K₂O).

B. Identificación y caracterización de la especie vegetal

Las muestras obtenidas contaban con una codificación emitida por el Instituto de Innovación Agraria INIA, estas fueron codificadas nuevamente para mayor facilidad al momento de realizar la parte experimental de la extracción de Capsaicina.

La identificación de la especie vegetal y de los componentes del estudio IPGRI a para los parámetros de datos de planta, inflorescencia y parte vegetativa, fueron realizados en la estación experimental de Santa Rita de Siguan. Se tuvo especial cuidado al momento de analizar estos parámetros para no dañar las plantas de rocoto de ninguna manera.

Las muestras fueron empacadas en bolsas herméticas hasta su llegada al laboratorio. El análisis de fruto y semillas se realizó a la llegada del laboratorio. Posterior al análisis las muestras fueron congeladas para evitar la degradación de la especie

vegetal y de la Capsaicina. La nueva codificación de las muestras de rocoto se describe de en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14. Codificación de las muestras recolectadas

CÓDIGOS		
	Código de Variedad INIA	Código Extracción
1	PER007185	A
2	PER007110	B
3	PER007115	C
4	PER007144	D
5	PER007182	E
6	PER007114	F
7	PER007109	G

C. Componentes de estudio IPGRI

Los componentes de estudio a tener como parámetros fueron: color del hipocotíleo, pubescencia del hipocotíleo, color de hoja cotiledónea, ciclo de vida, color del tallo, antocianina del nudo, forma del tallo, pubescencia del tallo, altura de la planta, hábito de crecimiento de la planta, ancho de la planta, longitud del tallo, diámetro del tallo, densidad de ramificación, macollamiento, densidad de hojas, color de hoja, forma de la hoja, margen de la lámina foliar, pubescencia de la hoja, longitud de la hoja madura, ancho de la hoja madura, días de floración, numero de flores por axila, posición de la flor, color de la corola, color de la mancha de la corola, forma de la corola, longitud de la corola, color de las anteras, longitud de las anteras, longitud de la antera, color de filamento, longitud de filamento, exención de estigma, esterilidad masculina, pigmentación del cáliz, margen de cáliz, constricción anular de cáliz, días a la fructificación, color del fruto en estado maduro, forma del fruto, longitud del fruto, ancho del fruto, peso del fruto, longitud de pedicelo del fruto, espesor de la pared del fruto, forma del fruto en la unión con el pedicelo, cuello en la base del fruto, forma del ápice del fruto, apéndice del fruto, vestigio de la floración, arrugamiento transversal del fruto, numero de lóculos, tipo de epidermis del fruto,

pedicelo con el fruto, pedicelo con el tallo, longitud de la placenta, condición de mezcla varietal, color de la semilla, superficie de la semilla, tamaño de la semilla, diámetro de la semilla, números de semillas por fruto, peso de frutos.

Estos parámetros están subdivididos en secciones: parte vegetativa, datos de la planta, inflorescencia, fruto y semillas. Con respecto a la descripción y análisis morfológico, se eligió una opción por parámetro a evaluar de los componentes de estudio IPGRI para las siete variedades de rocoto.

En la tabla N° 15 se reportan los resultados de la evaluación de las siete variedades de rocoto para los parámetros de parte vegetativa según el descriptor IPGRI para *Capsicum Pubescens*. Asimismo en la tabla N° 16 se reportan los resultados de la evaluación de las 7 variedades de rocoto para los parámetros de semillas según el descriptor IPGRI.

Tabla N° 15. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de parte vegetativa.

PARÁMETRO Parte Vegetativa		ACCESIÓN						
Código de extracción		A	B	C	D	E	F	G
Código de accesión		PER 007 185	PER 007 110	PER 007 115	PER 007 144	PER 007 182	PER 007 114	PER 007 109
a	Color del hipocotileo	3	3	3	3	3	3	3
b	Pubescencia del hipocotileo	7	7	7	7	7	7	7
c	Color hoja cotiledónea	2	2	2	2	2	2	2
d	Forma hoja cotiledónea	3	3	3	3	3	3	3
e	Longitud de la hoja cotiledónea	1.34	1.4	1.36	1.42	1.34	1.34	1.38
f	Ancho de la hoja cotiledónea	0.54	0.4	0.46	0.36	0.46	0.5	0.28

Tabla N° 16. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de semillas.

PARÁMETRO Semillas		ACCESIÓN						
Código de extracción		A	B	C	D	E	F	G
a	Color de la semilla	3	2	3	2	1	3	3
b	Superficie de la semilla	3	3	3	3	3	3	3
c	Tamaño de la semilla	7	7	7	7	7	7	7
d	Diámetro de la semilla	0.5	0.52	0.56	0.52	0.5	0.51	0.56

e	Peso de 1000 semillas [g]	No se llegó a pesar 1000 semillas por falta de cantidad de muestra						
f	Numero de semillas por fruto	3	3	3	3	3	3	3
g	Numero promedio de semillas	150	342	60	115	200	97	45

En la tabla N° 17 se reportan los resultados de la evaluación de las 7 variedades de rocoto para los parámetros de datos de la planta según el descriptor IPGRI para *Capsicum Pubescens*.

Tabla N° 17. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de datos de la planta.

PARÁMETRO		ACCESIÓN						
Datos de la planta		A	B	C	D	E	F	G
Código de extracción		A	B	C	D	E	F	G
g	Ciclo de vida	3	3	3	3	3	3	3
h	Color del tallo	3	3	3	3	3	3	3
i	Antocianina del nudo	5	5	5	5	5	5	5
j	Forma del tallo	2	2	2	2	2	2	2
k	Pubescencia del tallo	7	3	5	7	7	5	7
l	Altura de planta	1.35	0.77	0.73	0.74	0.54	0.73	1.24
m	Habito de crecimiento	3	5	5	5	3	5	5
n	Ancho de planta	1.5	1.24	1.29	1.4	1.17	1.29	1.82
o	Longitud de tallo	1.36	0.91	1.18	1.16	0.86	1.06	1.62
p	Diámetro de tallo	2.92	1.9	2.44	1.88	2.3	1.97	1.96
q	Densidad de ramificación	5	5	5	5	5	5	5
r	Macollamiento	5	5	5	5	5	5	5
s	Densidad de hojas	7	7	7	7	7	7	7
t	Color de la hoja	3	3	3	3	3	3	3
u	Forma de la hoja	2	2	2	2	2	2	2
v	Margen de la lámina foliar	1	1	1	1	1	1	1
w	Pubescencia de la hoja	5	5	5	5	5	5	5
x	Long. hoja madura	6.01	6.66	6.61	9.11	8.44	6.59	7.83
y	Ancho hoja madura	3.21	5.3	4.61	5.12	4.47	4.94	5.44

Para los parámetros de longitud, sus datos están expresados en cm.

Seguidamente, podemos observar en la tabla N° 18 el reporte de los resultados de la evaluación de las 7 variedades de rocoto para los parámetros de inflorescencia según el descriptor IPGRI para *Capsicum Pubescens*.

Tabla N° 18. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para la sección de datos de Inflorescencia.

PARÁMETRO Inflorescencia		ACCESIÓN						
Código de extracción		A	B	C	D	E	F	G
a	Días de floración	35	25	45	26	23	28	31
b	Nro. De flores por axila	1	1	1	1	1	1	1
c	Posición de flor	7	7	7	7	7	7	7
d	Color de la corola	5	5	5	7	7	5	5
e	Color de la mancha de la corola	1	1	1	1	1	5	5
f	Forma de la corola	2	2	2	2	2	2	2
g	Long. de la corola (cm)	1.12	1.27	1.2	1.22	0.87	1.34	1.27
h	Color de las anteras	5	5	5	5	5	5	5
i	Long. de las anteras	0.26	0.31	0.26	0.26	0.24	0.27	0.29
j	Color del filamento	5	5	5	5	5	5	5
k	Long. del filamento	0.33	0.42	0.49	0.41	0.26	0.38	0.61
l	Exserción del estigma	5	5	5	5	5	5	5
m	Esterilidad masculina	0	0	0	0	0	0	0
n	Pigmentación del cáliz	1	1	1	1	1	1	1
o	Margen del cáliz	3	3	3	3	3	3	3
p	Constricción anular del cáliz	1	1	1	1	1	1	1



Figura N°14. Vista de planta y flor del cultivo de rocoto de la Estación Experimental de Santa Rita de Siguan.

En la tabla N° 19 se reportan los resultados para los parámetros de fruto de la planta.

Tabla N° 19. Resultados de la evaluación mediante el descriptor IPGRI, para fruto.

PARÁMETRO Fruto		ACCESIÓN						
Código de extracción		A	B	C	D	E	F	G
A	Días de la fructificación (días desde el trasplante)	126 - 130	120 - 130	121 - 130	124 - 130	125 - 130	123 - 130	122 - 130
B	Manchas o rayas antocianínicas	1	1	1	1	1	1	1
C	Color del fruto en el estado intermedio	3	3	4	3	3	4	4
D	Cuajado del fruto	5	5	5	7	7	5	7
E	Periodo de fructificación (días)	60	60	60	60	60	60	60
F	Color del fruto en estado maduro	Verde	Verde	Naranja	Verde	Verde	Naranja Amarillo	Rojo Oscuro
G	Forma del fruto (promedio de frutos)	3	4	4	5	5	2	3
H	Longitud del fruto (promedio de frutos)	5	6.5	5	4.5	5.7	4.3	5.3
I	Ancho del fruto (promedio de frutos)	3.5	4.5	4	5	5.5	4	3.2
J	Peso del fruto (peso promedio de cada fruto) (g)	70	80	60	80	95	50	45
K	Longitud del pedicelo del fruto	3.9	3.11	2.94	3.29	4.6	2.6	2.78
L	Espesor de la pared del fruto (mm)	5	8	6	7	7	4	5
M	Forma del fruto en la unión con el pedicelo	4	5	4	5	5	3	3
N	Cuello en la base del fruto	1	1	1	0	1	0	0
O	Forma del ápice del fruto	2	3	1	3	3	2	2
P	Apéndice en el fruto	0	0	0	0	0	0	0
Q	Arrugamiento transversal del fruto	5	5	3	5	7	3	3
R	Numero de lóculos	2	3	2	3	4	4	3
S	Tipo de epidermis del fruto	3	2	1	1	3	3	3
T	Persistencia: pedicelo con el fruto	7	7	7	7	7	7	3
U	Persistencia: pedicelo con el tallo	3	3	3	3	3	3	3
V	Longitud de la placenta	3	3	3	3	3	3	2
w	Condición de mezcla varietal	3	3	3	3	3	3	3

Las características más remarcables y las variables escogidas de este estudio a analizar y comparar con el contenido de Capsaicina de cada variedad de rocoto fueron color, numero de lóculos, cantidad de semillas y color de semillas.

Variedad A

La variedad A, correspondiente al código de variedad PER007185, se caracterizó por presentar color verde, contar con 2 números de lóculos, 150 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color negro.

Variedad B

La variedad B, correspondiente al código de variedad PER007110, se caracterizó por presentar color verde, contar con 3 números de lóculos, 342 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color marrón.

Variedad C

La variedad C, correspondiente al código de variedad PER007115, se caracterizó por presentar color naranja, contar con 2 números de lóculos, 60 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color negro.

Variedad D

La variedad D, correspondiente al código de variedad PER007144, se caracterizó por presentar color verde, contar con 3 números de lóculos, 115 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color marrón.

Variedad E

La variedad E, correspondiente al código de variedad PER007182, se caracterizó por presentar color verde, contar con 4 número de lóculos, 200 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color amarillo obscuro (paja).

Variedad F

La variedad F, correspondiente al código de variedad PER007114, se caracterizó por presentar color naranja amarillo, contar con 4 números de lóculos, 97 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color negro.

Variedad G

La variedad G, correspondiente al código de variedad PER007109, se caracterizó por presentar color rojo, contar con 3 números de lóculos, 45 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color negro.

4.1.2 Método de extracción

A. Preparación de las Muestras

En la primera prueba piloto se observó que la Capsaicina, al momento de licuar los rocotos se volatilizaba en algún porcentaje, ya que posterior al licuado emitía un gas sumamente picante; por esta razón se decidió congelar los rocotos a 10 C° y así evitar este proceso, de tal manera que la homogenización de rocotos se realizó con los rocotos en un estado de semi descongelación para que permitiera cortarlos en trozos más pequeños, para poder efectuar el proceso de recolección de semillas y separar de esta manera la pulpa de las semillas; de esta manera se contó con dos tipos de muestra por cada variedad de rocoto; muestra de pulpa y muestra de semillas.

En cuanto a la velocidad de homogenización, al emplear la licuadora se utilizó alternando la velocidad de cuchillas para evitar degradación por fricción, teniendo precaución del gas de evaporación que salía de la licuadora ya que este era altamente irritante.

B. Extracción de Capsaicina

En la abundante bibliografía existente sobre los capsaicinoides se observa que se utiliza una gran variedad de métodos de extracción de capsaicinoides en pimientos, como puede ser la maceración y la extracción en equipo Soxhlet. En los últimos años han cobrado una gran importancia nuevas técnicas de extracción, como la extracción mediante agitación magnética, la extracción enzimática, la extracción asistida por microondas, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción asistida por ultrasonidos, que en las últimas décadas se han estudiado para el análisis de compuestos naturales en plantas y alimentos.

La selección del disolvente más apropiado a la hora de extraer los analitos de interés de la matriz de la muestra es un paso fundamental a la hora de desarrollar cualquier método de extracción.

Por un lado la efectividad de la extracción asistida por ultrasonido va a depender de la capacidad que tenga el disolvente de extracción para absorber y transmitir la energía de los ultrasonidos. Además, los capsaicinoides deben de ser solubles en el disolvente que empleemos para la extracción. Los disolventes que se han estudiado para extraer los capsaicinoides de la matriz de la muestra han sido el metanol, etanol, acetonitrilo y agua.

Es entonces que, teniendo en cuenta la extensa información y discrepancia de datos bibliográficos se optó intentar la extracción asistida por ultrasonido con todas las variables posibles como son temperatura, tiempo, relación analito-solvente y solvente de extracción. Para ello primero se pesó 1 g de cada una de las muestras y se les añadió 10 mL de solvente para cada caso de las diferentes pruebas piloto.

En la primera prueba piloto, se utilizó metanol, etanol, acetonitrilo y agua. Los resultados mostraron que el agua no debía ser usada como solvente de extracción a pesar de lo mencionado anteriormente, ya que por su naturaleza lipídica y polaridad esta no era soluble en agua y el porcentaje de extracción fue muy pequeño.

C. Determinación de parámetros de extracción

Se realizaron 108 pruebas piloto para cada solvente, experimentos realizados por triplicado, modificando diferentes variables y analizando sus resultados mediante cromatografía líquida de alta performance - *HPLC* para poder llegar a alcanzar las condiciones óptimas de extracción.

Tabla N° 20. Parámetros evaluados en las pruebas piloto a diferentes condiciones

Solvente	Tiempo de Extracción (Min)	Temperatura de Extracción (°C)	Relación Analito Solvente (g: mL)
Metanol	10-20-30-40-50-60	20-25-30-35-40-50	1:5 1:10 1:20
Etanol	10-20-30-40-50-60	20-25-30-35-40-50	1:5 1:10 1:20
Acetonitrilo	10-20-30-40-50-60	20-25-30-35-40-50	1:5 1:10 1:20

No se excedió de 60 °C para no exceder el punto de ebullición de metanol 64.7 °C, etanol 78.7 °C y acetonitrilo 82 °C.

Entonces, posterior al análisis de cada posible combinación de los parámetros anteriormente mostrados, se demostró que los parámetros óptimos de extracción sería el tratamiento con 10 mL de metanol como solvente extractivo por cada 1 g de muestra, en relación 1:10, durante 20 minutos a una temperatura de 25 C° demostró tener las mejores condiciones de extracción.

El notable estudio realizado por M. Collins en 1995 y reconocido a nivel mundial como uno de los estudios comparativos más importantes realizados en relación a la extracción de capsaicinoides en el género *Capsicum*, nos indica el uso de metanol como solvente de extracción en relación 1:10 analito solvente, Este estudio utiliza como único método de extracción, un baño caliente durante 4 horas. Este mismo estudio asegura que agua no es un muy buen disolvente a la hora de extraer capsaicinoides, pero en determinadas ocasiones, la adición de pequeños porcentajes de agua en el disolvente de extracción, ayuda a incrementar la eficacia de extracción de los analitos de interés de la muestra. ⁽¹⁸⁾

De igual manera otros estudios indican como mejor solvente de extracción al metanol en relación 1:10 analito solvente, obteniendo mejores rendimientos y menores interferencias. Reportando una gran eficacia de extracción con pequeñas cantidades de pigmentos y aceites extraídos con la Capsaicina. ^{(21), (110), (111), (112), (113)}

Los parámetros de estos estudios coinciden con los parámetros finales establecidos para el método de extracción de este estudio.

Tabla N° 21. Parámetros finales establecidos para el método de extracción.

Parámetros de extracción	
Método de extracción	Ultrasonido
Cantidad De Solvente	10 mL
Solvente	metanol
Muestra	1 g
Relación	1:10
Tiempo	20 minutos
Temperatura	25 C°.

Asimismo se tuvo sumo cuidado con la extracción asistida por ultrasonido para no romper los tubos contenedores de muestra, como se ve en la figura N°15.



Figura N°15. Vista del Equipo de extracción asistida por ultrasonido, con muestras de rocoto.

4.1.3 HPLC

Estudios realizados entre los años 1950 y 1960, en donde no se contaba con la cromatografía líquida de alta performance -HPLC, la separación se realizaba en placas de sílice y luego se cuantificaba la Capsaicina presente por Espectrofotometría. ⁽¹¹⁴⁾

El análisis de Capsaicina o compuestos capsaicinoides se realizó en las décadas de los 80's y 90's por Espectrofotometría, posteriormente con el incremento de tecnologías este análisis comenzó a realizarse por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta performance -HPLC. En el año 2002 se realizó la separación de Capsaicina y Dihidrocapsaicina extraídos de Chile Habanero. ^{(111), (115)} Desde entonces, esta es la técnica utilizada mayoritariamente en los últimos años para la determinación y cuantificación de Capsaicina.

4.1.3.1 Desarrollo patrones cromatográficos

A. Preparación de Solución Stock

Se tomó la precaución de usar guantes y mascarilla ya que no se debe manipular ni inhalar la Capsaicina concentrada para que no entre en contacto con la piel ya que la Capsaicina es un irritante de la piel y de las mucosas.

Tabla N° 22. Concentración de estándares

Estándar	Volumen de alícuota (mL)	Concentración Capsaicina (ppm)
Solución Stock		1000
1	2	200
2	5	100
3	5	50
4	5	25
5	5	12.5

Concentración de estándares (El volumen total de cada uno de los estándares fue completado con metanol $\geq 99\%$ HPLC)

B. Preparación de Estándares

Posterior a la diluciones de la solución madre se consiguió tener 5 estándares los cuales se corrieron en el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. La concentración final de cada uno de los estándares se muestra en la tabla N° 22.

C. Preparación de fase móvil y desgasificación

El procedimiento de filtración se efectuó por dos motivos, para evitar impurezas o contaminación en el solvente, así como remoción de partículas inertes y para desgasificar el solvente ya que gases disueltos en la fase móvil puede producir inconvenientes tales como: liberación de burbuja en el cabezal de la bomba, celda de detector, pérdida de sensibilidad en los detectores de fluorescencia y oxidación de los analitos.

D. Determinación de longitud de onda

El barrido espectral se realizó mediante el equipo de *HPLC*, para este barrido se tomó valores desde 200 nm hasta 300 nm.

Después de efectuar el correspondiente barrido espectral con el equipo de *HPLC*, se observó el cromatograma a diferentes tipos de visión pudiendo determinar de esta forma la mejor longitud de onda. Para el caso de Capsaicina se determinó que 280 nm sería la mejor longitud de onda.

Se realizó adicionalmente una prueba de pureza de pico demostrando así que solo se trata de un compuesto y no existen compuestos sobrelapados.

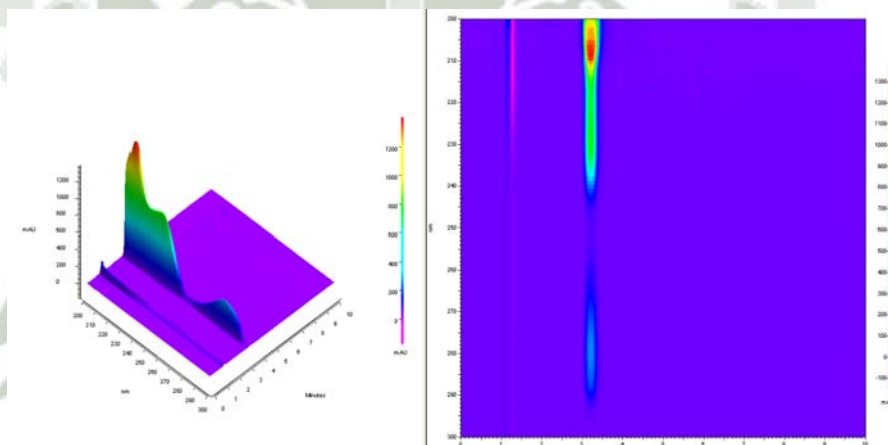
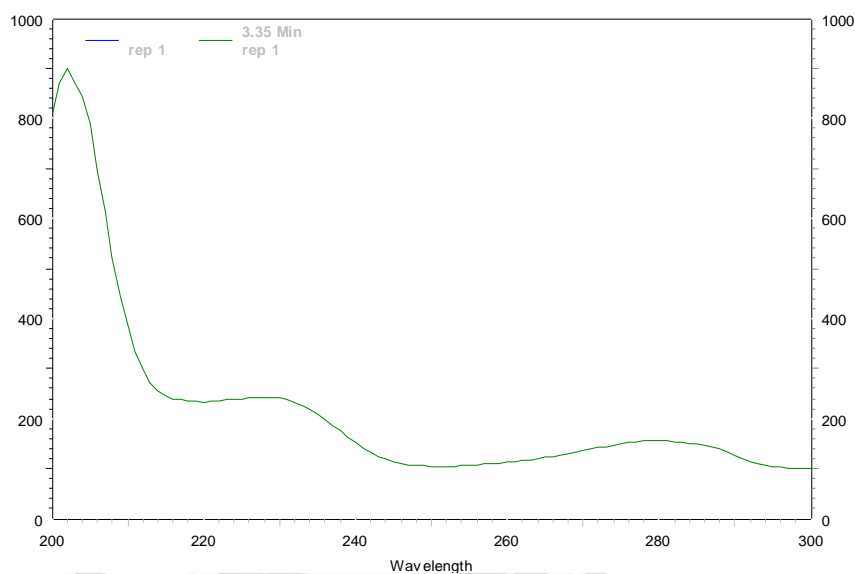


Figura N°16. Figura del barrido espectral de patrón de Capsaicina en software del equipo de *HPLC*

E. Estandarización del método

Posterior a varias corridas cromatográficas, donde se evaluó los resultados finales de área de pico, ruido y tiempo de retención, se determinó que los parámetros óptimos para el método de determinación y cuantificación de Capsaicina serían los mostrados en la tabla N° 23.

Se utilizó agua acidificada con 2 mL de ácido acético glacial para cada litro de agua; con este procedimiento se acidificó el agua y de esta manera mantuvo estable el pH de la fase móvil.

Tabla N° 23. Condiciones del Método

Condiciones del Método	
Fase Estacionaria	Columna LiChroCART ® RP-C18(5 µm) de acero Inoxidable
Fase Móvil	68 % metanol 32 % agua acida
Sistema	Isocratico
Flujo	1 mL/Min
Longitud De Onda	280 nm
Temperatura De La Columna	45°C
Volumen De Inyección	20µL para estándar 10 µL para muestras
Numero de repeticiones	3
Tiempo de retención	3.2 min
Tiempo no retenido (ruido)	1 min
Tiempo total de corrida	10 min
Método de calculo	Estándar externo

F. Curva de calibración

La curva de calibración se elaboró a partir de las diluciones efectuadas de la solución stock de 1000 ppm del estándar de Capsaicina; obteniendo datos del área por triplicado como se muestran en la tabla N° 24.

Tabla N° 24. Datos para la curva de calibración de Capsaicina

Datos Referenciales		Área de Curva		
Estándar	Concentración (ppm)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
5	12.5	303720	281111	300138
4	25	568410	570255	585574
3	50	1098119	1126188	1118651
2	100	2116844	2148021	2147139
1	200	4331391	4332876	4348000

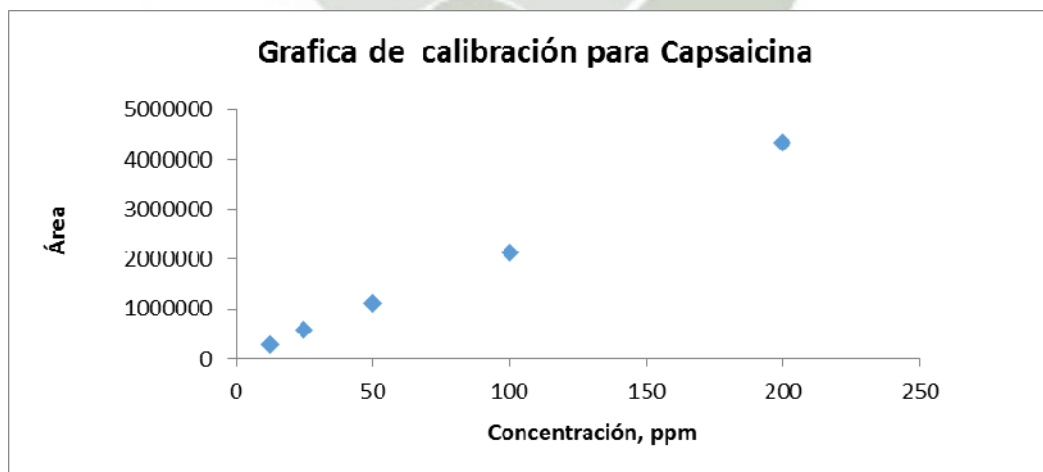
Para los datos cuantitativos se utilizaron medias descriptivas numéricas como muestra la tabla N° 25.

Tabla N° 25. Descripción de los datos cuantitativos

Estándar	Concentración (Ppm)	Área De Curva			Promedio Área	S	DSR %
		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3			
5	12.5	303720	281111	300138	294989.6667	12151.9843	4.12
4	25	568410	570255	585574	574746.3333	9422.30228	1.64
3	50	1098119	1126188	1118651	1114319.333	14527.2052	1.30
2	100	2116844	2148021	2147139	2137334.667	17750.9168	0.83
1	200	4331391	4332876	4348000	4337422.333	9190.57019	0.21

Como medida de tendencia central se tomó el valor promedio y como medida de variabilidad la desviación estándar, S y la desviación estándar relativa, RSD. Los resultados individuales son próximos uno del otro, alrededor del valor promedio, entonces el error aleatorio es pequeño, lo cual indica que los resultados son precisos, tal y como se muestra en la figura N° 17.

Figura N° 17. Grafica de la calibración en función a su desviación estándar



La desviación estándar relativa RSD, es la expresión del porcentaje de variabilidad de los resultados experimentales, es entonces que a mayor concentración de los estándares, los datos tienden a tener menor variabilidad. Asimismo se estima el error relativo, entre más pequeño sea el error, mayor es la precisión de los resultados experimentales.

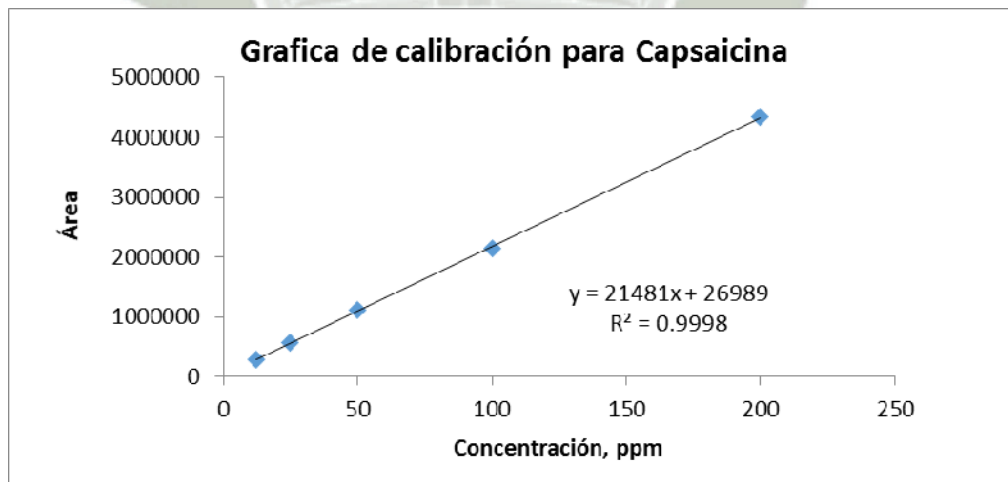
G. Linealidad

La linealidad, es determinada por la capacidad del método para obtener respuestas de una serie de patrones de concentración conocida dentro del rango de interés proporcionales a la concentración del analito. Para establecer el mejor ajuste de la recta de regresión se emplea el método de los mínimos cuadrados. Se calcula el valor del intercepto, la pendiente de la recta y la varianza de los puntos alrededor de esta.

Rango de trabajo es el intervalo entre la más alta y más baja concentración del analito en la muestra, para la cual se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel apropiado de precisión, veracidad y linealidad.

Seguidamente, para determinar la linealidad del método, se elaboró la representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas con los valores experimentales, como se muestra en la figura N° 18.

Figura N° 18. Grafica de calibración de Capsaicina



Se realizó una regresión lineal a partir del rango de las concentraciones de los estándares y el valor promedio del área, también se obtuvo el coeficiente de correlación $r = 0.999$, una pendiente $b = 21481$ y un intercepto $a = 26989$.

La curva de calibración de Capsaicina presenta la siguiente ecuación: $y = 21481x + 26989$.

La relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (área) se expresó matemáticamente efectuando una regresión estadística, así como se expresa en la tabla N° 26.

Tabla N° 26: Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión

Estadística de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9999
Coefficiente de determinación R^2	0.9998
R^2 ajustado	0.9998
Error típico	25296.8
Observaciones	5

Sabiendo que el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t calculado para el nivel de confianza requerido. Si el valor observado es mayor que el de la tabla, entonces se concluye que la correlación lineal es significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Para esta prueba estadística se realizó el análisis de varianza cuyos resultados se muestran en la tabla N° 27.

Tabla N° 27. Análisis de varianza para la determinación de la linealidad

ANÁLISIS DE VARIANZA		Promedio de			Valor crítico	
	Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de los cuadrados	F(calculado)	de F (tabla)	
		1.07283E+1	1.07283E+1	16764.7609		
Regresión	1	3	3	8	1.01574E-06	
Residuos	3	1919789517	639929839.1			
Total	4	1.07302E+1	3			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
a	26989.22222	17126.03796	1.575917459	0.21313083	- 27513.47401	81491.9184
b	21480.94509	165.9031767	129.4788051	1.01574E-06	20952.96714	22008.9230

Los resultados del análisis de varianza mostrados en la tabla N° 27 muestran que $P < 0.05$ lo que nos indica una alta correlación entre los datos de concentración y su respuesta, concluyendo que el método presenta proporcionalidad entre la concentración del analito y su área producida.

Se confirma linealidad si se cumplen los siguientes criterios: Que el Coeficiente de correlación lineal (r) debe ser mayor a 0.995 en nuestro caso $r = 0.9999$.

El Análisis de varianza de la regresión lineal debe demostrar paso del intercepto por cero, en este caso el valor calculado de F es de 16764.76098 y el valor crítico de F establecido por tablas es de 1.01574E-06 cumpliendo que el $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tablas}}$, lo cual nos indica un ajuste lineal.

Un análisis estadístico usando el T de Student sea $T > a T_{tablas}$, en nuestro caso es $1.01574E-06$, valor que cumple este criterio. De esta manera si se cumplen tres criterios confirmando la linealidad del método.

H. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico que corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. En la tabla N° 28 se muestran los valores necesarios para su determinación.

Tabla N° 28. Valores para la determinación de la sensibilidad

Determinación de Sensibilidad		
Respuesta cuando X es cero	Y_{bl}	26989.2222
Desviación Estándar cuando X es cero	S_{bl}	6.8304309
Numero de datos	n	5
Pendientes	b	21480.9451

Límite de detección (LD), El cual corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra.

$$(LD) = (Y_{bl} + 3 S_{bl}) / b$$

$$(LD) = 1.26 \text{ ppm}$$

Límite de Cuantificación (LC): Corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en las condiciones establecidas.

$$(LC) = (Y_{bl} + 10 S_{bl}) / b$$

$$(LC) = 1.00 \text{ ppm}$$

I. Precisión

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos realizados sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. La precisión de un método fue estudiada sobre el sistema, evaluando la dispersión de al

menos 6 lecturas del estándar. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas. Así la USP indica una DSR del sistema de no más de 2%, leyendo 5 veces una solución estándar.

Tabla N° 29. Valores para la determinación de la precisión

Muestra	Área	Concentración	
		Calculada	Teórico
1	1117020	50.4	50
2	1119123	50.49	50
3	1123449	50.7	50
4	1111933	50.16	50
5	1120765	50.57	50
6	1126188	50	50
Promedio	1119746.33	50.39	
S	5002.24	0.26	
DSR %	0.45	0.52	
Intervalo de Confianza	4002.55339	0.20973548	

Para este análisis se realizó 6 medidas de un estándar a una concentración de 50 ppm, para determinar el grado de concordancia, obteniéndose así una desviación estándar relativa, RSD de 0.52 %, considerándose una RSD adecuada. Además se realizó una prueba estadística t de Student, donde encontramos que $P > 0.05$ lo que indica que no existiría diferencia significativa entre la concentración teórica y la hallada, es así que podemos afirmar que el método realizado es un método preciso.

Tabla N° 30. Valores del análisis estadístico

Valores del análisis estadístico		
	Concentración	
	Calculada ppm	Teórica ppm
Media	50.39	50
Varianza	0.07	0
Observaciones	6.00	6
Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	5.00	
Estadístico t	3.61	
P(T<=t) una cola	0.01	
Valor crítico de t (una cola)	2.02	
P(T<=t) dos colas	0.02	
Valor crítico de t (dos colas)	2.57	

4.1.4 Cuantificación de Muestras

La determinación e identificación de Capsaicina para las 7 variedades de rocoto se realizó medio de *HPLC* comparando el tiempo de retención del pico obtenido en el análisis cromatográfico de cada muestra con el tiempo de retención del estándar de Capsaicina, bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Fueron analizadas 7 acciones de rocoto, con dos tipos de muestra: pulpa y semillas respectivamente, estas muestras se analizaron por triplicado para el método extractivo y también cada una de las muestras fue analizada por triplicado mediante *HPLC*, teniendo de esta manera un total 126 corridas cromatográficas.



Figura N°19. Vista integral del equipo de *HPLC*

El equipo de *HPLC* muestra el tiempo de retención de los picos obtenidos en el análisis cromatográfico de las diferentes muestras, deduciéndose que todos los productos analizados contienen Capsaicina, ya que se obtuvo un pico con un tiempo de retención similar al del estándar. Las pequeñas fluctuaciones de segundos se pueden deber a distintos componentes que también pasan por la columna, posiblemente otros capsaicinoides.



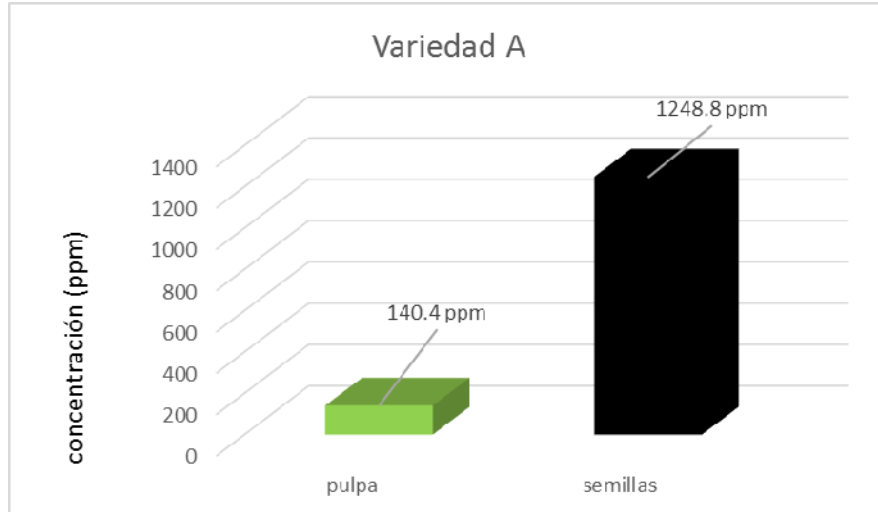
Figura N°20. Vista de viales con muestras de cada variedad de *Capsicum pubescens*

En la tabla N° 31 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad A de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 31. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad A.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
A	pulpa	1	1	337068	2.93	14.48
			2	328488	2.92	14.1
			3	323630	2.91	13.88
		2	1	316888	2.91	13.57
			2	329811	2.92	14.15
			3	330888	2.94	14.2
		3	1	328765	2.91	14.11
			2	331550	2.91	14.23
			3	318232	2.91	13.63
	semillas	1	1	2718137	3.22	121.81
			2	2865590	3.21	128.46
			3	2911033	3.22	130.51
		2	1	2771943	3.25	124.24
			2	2764852	3.25	123.92
			3	2700956	3.25	121.04
		3	1	2686264	3.25	120.37
			2	2719926	3.26	121.89
			3	2937598	3.21	131.7

Figura N° 21. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad A.

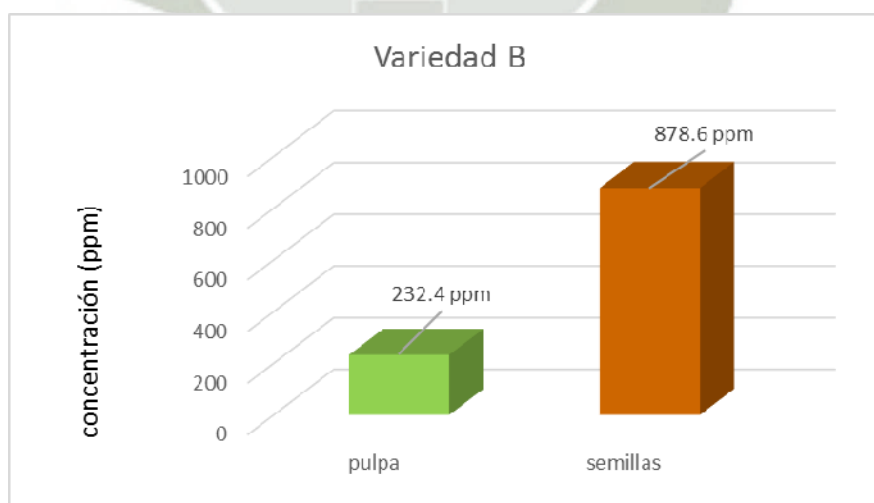


En la tabla N° 32 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad B de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 32. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad B.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
B	pulpa	1	1	542382	2.82	23.74
			2	537917	2.84	23.54
			3	557205	2.83	24.4
		2	1	521090	2.84	22.78
			2	537896	2.84	23.53
			3	531414	2.83	23.24
		3	1	518101	2.83	22.64
			2	533696	2.84	23.35
			3	502565	2.83	21.94
	semillas	1	1	1845451	3.23	82.47
			2	1953702	3.25	87.35
			3	1985135	3.25	88.77
		2	1	2011753	3.25	89.97
			2	2007230	3.25	89.77
			3	2027166	3.26	90.66
		3	1	1886249	3.25	84.31
			2	1996272	3.22	89.27
			3	1972674	3.24	88.21

Figura N° 22. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad B.

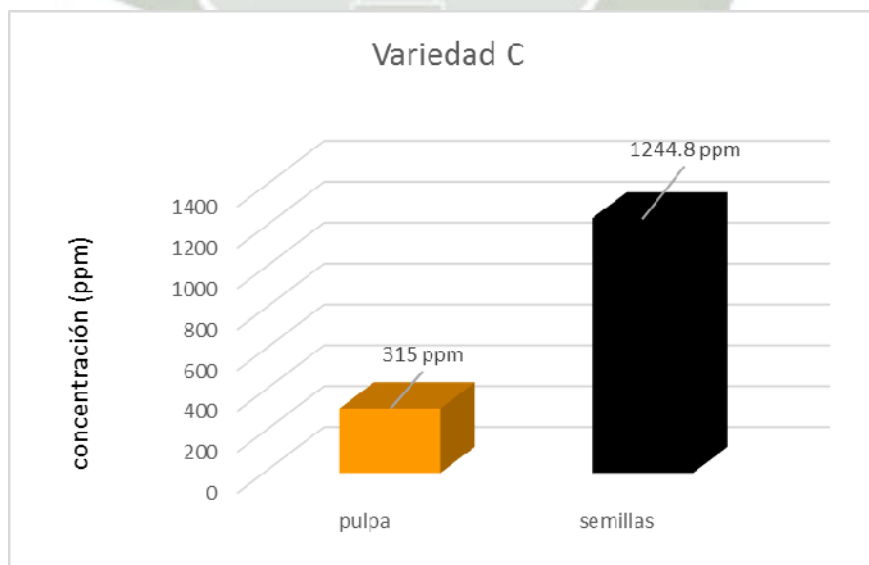


En la tabla N° 33 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad C de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 33. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad C.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
C	pulpa	1	1	694867	2.84	30.61
			2	704600	2.83	31.05
			3	706221	2.82	31.12
		2	1	697951	2.8	30.75
			2	706080	2.83	31.12
			3	725087	2.82	31.97
		3	1	704511	2.82	31.04
			2	760973	2.82	33.59
			3	732132	2.82	32.29
	semillas	1	1	2750733	3.24	123.28
			2	2831897	3.24	126.94
			3	2850296	3.25	127.77
		2	1	2774329	3.24	124.34
			2	2750424	3.26	123.27
			3	2785218	3.25	124.83
		3	1	2794756	3.25	125.26
			2	2741535	3.25	122.87
			3	2716693	3.25	121.75

Figura N° 23. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad C.

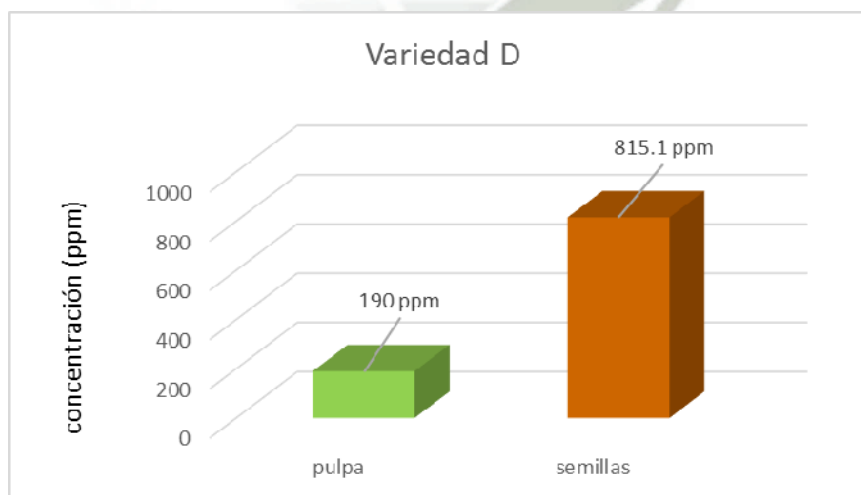


En la tabla N° 34 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad D de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 34. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad D.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
D	pulpa	1	1	401295	2.84	17.38
			2	413202	2.84	17.91
			3	419802	2.85	18.21
		2	1	435164	2.83	18.9
			2	470670	2.8	20.5
			3	466786	2.79	20.33
		3	1	421478	2.85	18.29
			2	443238	2.82	19.27
			3	463942	2.82	20.2
	semillas	1	1	1812923	3.25	81.01
			2	1755740	3.23	78.43
			3	1782826	3.22	79.65
		2	1	1776225	3.23	79.35
			2	1874888	3.23	83.8
			3	1819355	3.23	81.3
		3	1	1807511	3.24	80.76
			2	1900716	3.24	84.96
			3	1887230	3.24	84.36

Figura N° 24. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad D.

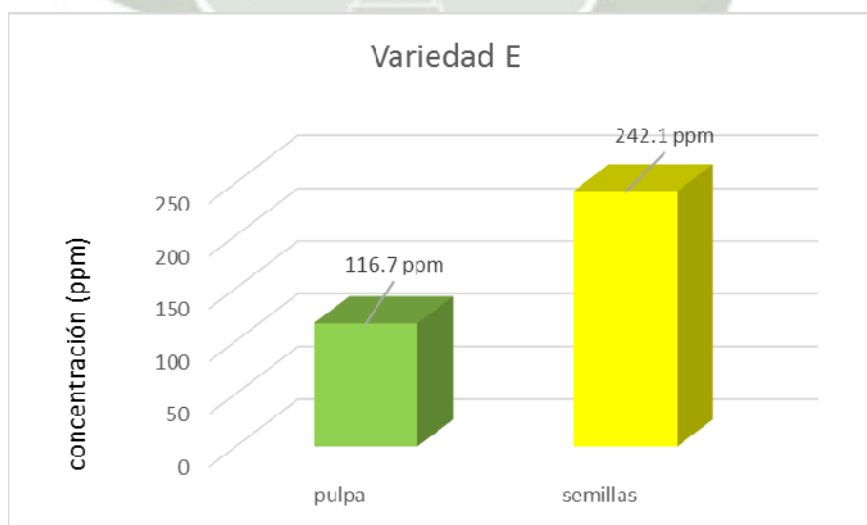


En la tabla N° 35 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad E de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 35. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad E.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
E	pulpa	1	1	260247	2.82	11.02
			2	286684	2.82	12.21
			3	278527	2.81	11.84
		2	1	249750	2.8	10.55
			2	291060	2.8	12.41
			3	276730	2.81	11.76
		3	1	268467	2.81	11.39
			2	270791	2.8	11.49
			3	290187	2.79	12.37
	semillas	1	1	548646	3.26	24.02
			2	527560	3.26	23.07
			3	541059	3.27	23.68
		2	1	562280	3.27	24.63
			2	589479	3.27	25.86
			3	554434	3.26	24.28
		3	1	549913	3.26	24.08
			2	536692	3.28	23.48
			3	565395	3.28	24.77

Figura N° 25. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad E.

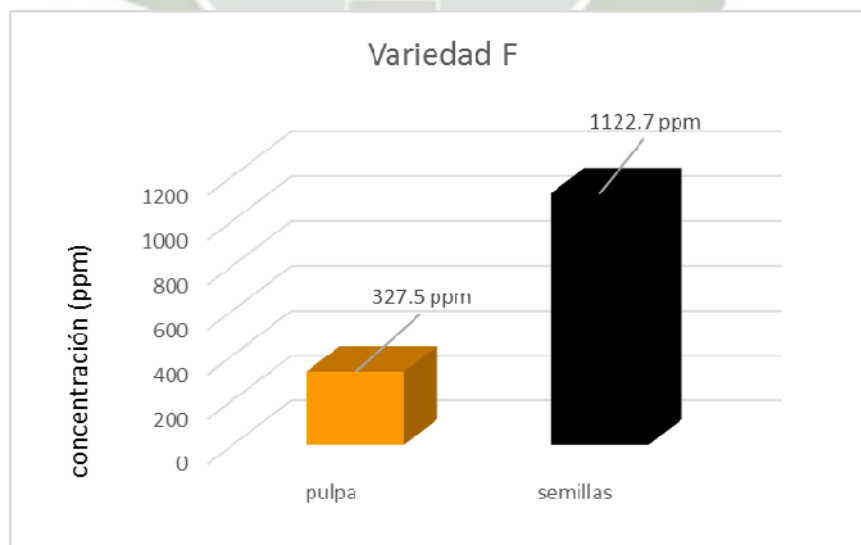


En la tabla N° 36 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad F de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 36. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad F.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo	
F	pulpa	1	1	736071	3.26	32.47	
			2	745788	3.25	32.91	
			3	741258	3.25	32.7	
		2	1	761295	3.26	33.6	
			2	769615	3.25	33.98	
			3	719890	3.26	31.74	
		3	1	748547	3.26	33.03	
			2	699247	3.25	30.81	
			3	758246	3.24	33.47	
		semillas	1	1	2488018	3.22	111.44
				2	2504981	3.26	112.2
				3	2482939	3.26	111.21
	2		1	2515249	3.27	112.67	
			2	2451285	3.25	109.78	
			3	2569719	3.21	115.12	
	3		1	2466435	3.21	110.46	
			2	2588821	3.25	115.98	
			3	2491374	3.25	111.59	

Figura N° 26. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad F.

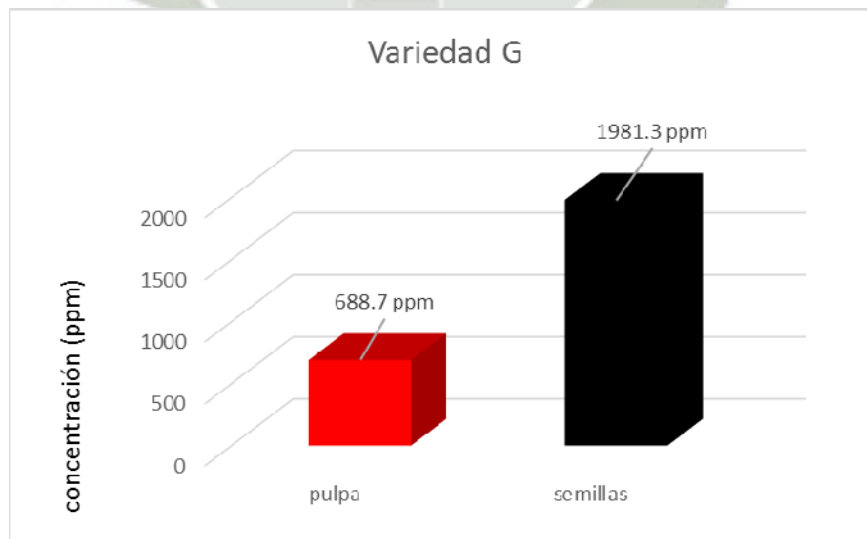


En la tabla N° 37 podemos observar los datos de cada corrida cromatográfica para la variedad G de *Capsicum pubescens*, mostrando su área de pico, su tiempo de retención y su concentración en ppm.

Tabla N° 37. Datos de cada corrida cromatográfica de la variedad G.

Variedad	Tipo de Muestra	Tubo	Replica	Capsaicina Área de Pico	Capsaicina Retención Minutos	Concentración reportada por el equipo
G	pulpa	1	1	1576544	3.24	70.35
			2	1573169	3.24	70.2
			3	1639549	3.24	73.19
		2	1	1610567	3.26	71.89
			2	1591470	3.26	71.03
			3	1463635	3.26	65.26
		3	1	1482123	3.25	66.1
			2	1487827	3.24	66.35
			3	1467097	3.26	65.42
	semillas	1	1	4341442	3.25	194.98
			2	4159342	3.25	186.77
			3	4459457	3.25	200.3
		2	1	4175988	3.25	187.52
			2	4318113	3.25	193.93
			3	4585359	3.24	205.98
		3	1	4454890	3.25	200.1
			2	4604432	3.25	206.84
			3	4602719	3.25	206.76

Figura N° 27. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para la variedad G.



4.1.5 Análisis de Resultados

La concentración de Capsaicina se calculó en base en el área de pico cromatográficos obtenido por muestra y su relación en comparación con el estándar. Las gráficas de las corridas cromatográficas se encuentran en el apartado de Anexos. Con los datos totales de los resultados de estas corridas se realizó un nuevo cálculo para obtener el promedio de los datos analizados por triplicado. Estos datos se muestran en la tabla N°38.

Tabla N° 38. Datos promedio del análisis mediante *HPLC*

Variedad	Muestra	Concentración reportada por el equipo	Área de Pico	Tiempo Retención min
		Promedio	Promedio	Promedio
A	pulpa	14.0	327257.8	2.9
A	semillas	124.9	2786255.4	3.2
B	pulpa	23.2	531362.9	2.8
B	semillas	87.9	1965070.2	3.2
C	pulpa	31.5	714713.6	2.8
C	semillas	124.5	2777320.1	3.2
D	pulpa	19.0	437286.3	2.8
D	semillas	81.5	1824157.1	3.2
E	pulpa	11.7	274715.9	2.8
E	semillas	24.2	552828.7	3.3
F	pulpa	32.7	742217.4	3.3
F	semillas	112.3	2506535.7	3.2
G	pulpa	68.9	1543553.4	3.3
G	semillas	198.1	4411304.7	3.2

Respecto a los valores de los tiempos de retención se puede observar una variación de algunos segundos, para el caso de muestras de pulpa el inicio del pico empieza a un tiempo de retención de 2.9 para la mayoría de los casos, y para las muestras de semillas el pico cromatográfico empieza es a un tiempo de retención de 3.2, este dato coincide con el tiempo de retención encontrado al correr el patrón de capsaicina.

La variación de 24 segundos no es significativa puesto que no existen otros picos cromatográficos muy cerca o superpuestos, los cuales podrían indicar la presencia de otro compuesto, como podría ser dihidrocapsaicina, compuesto que usualmente genera un pico menor a de capsaicina siempre después de la aparición de esta última o norhidrocapsaicina la cual genera un pico mucho menor y este aparece mucho antes del pico de capsaicina. ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾⁽¹¹²⁾

Es posible entonces que no se trate de otro compuesto, simplemente que el contenido de agua en las muestras de pulpa genere una pequeña interferencia desplazando la aparición del pico de capsaicina en algunos segundos. A este fenómeno se le conoce como efecto de la matriz; además se debe tener en consideración que los tiempos no son reproducibles a pesar de tratarse de una misma columna cromatográfica.

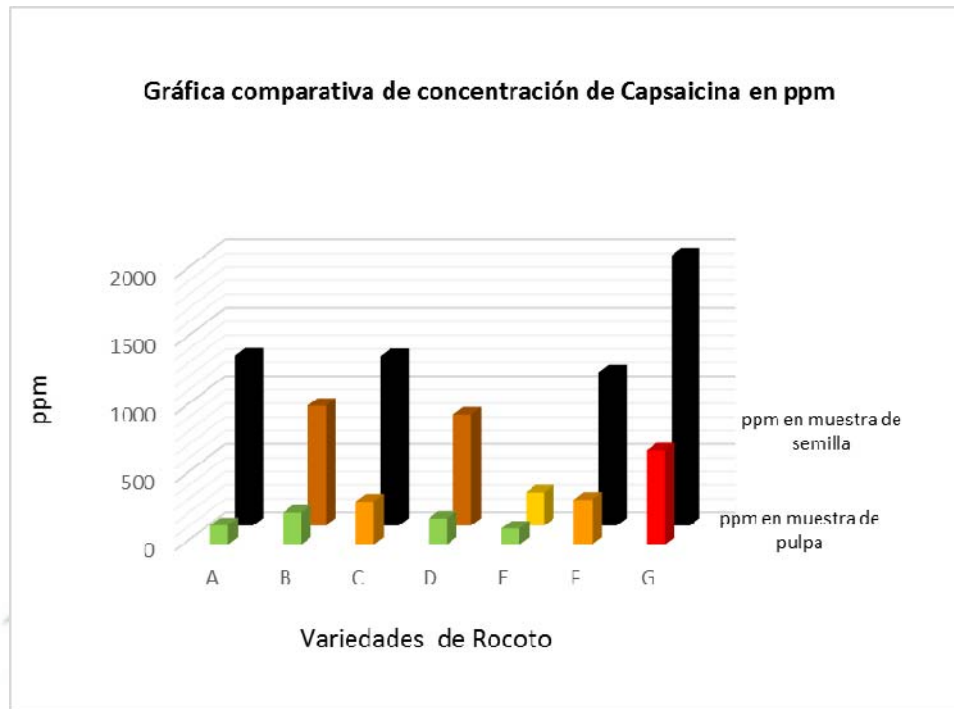
Finalmente se realizó un nuevo cálculo para determinar las ppm. También se calculó la relación mg encontrados de Capsaicina por kilo de muestra y porcentaje de recuperación de Capsaicina. Estos datos se muestran en la tabla N° 39.

Tabla N° 39. Datos finales de la concentración de Capsaicina en cada variedad de rocoto.

Accesión	# Lóculos	Tipo de muestra	Color de muestra	Promedio			
				Concentración reportada por el equipo	Capsaicina Totales ppm	Capsaicina mg /kilo	% Recuperación
A	2	pulpa	verde	14.04	140.4	140.4	0.01404
		semillas	negro	124.88	1248.8	1248.8	0.12488
B	3	pulpa	verde	23.24	232.4	232.4	0.02324
		semillas	marrón	87.86	878.6	878.6	0.08786
C	2	pulpa	naranja	31.50	315.0	315.0	0.03150
		semillas	negro	124.48	1244.8	1244.8	0.12448
D	3	pulpa	verde	19.00	190.0	190.0	0.01900
		semillas	marrón	81.51	815.1	815.1	0.08151
E	4	pulpa	verde	11.67	116.7	116.7	0.01167
		semillas	paja	24.21	242.1	242.1	0.02421
F	4	pulpa	naranja	32.75	327.5	327.5	0.03275
		semillas	negro	112.27	1122.7	1122.7	0.11227
G	3	pulpa	rojo oscuro	68.87	688.7	688.7	0.06887
		semillas	negro	198.13	1981.3	1981.3	0.19813

En la figura N° 28 se observa la concentración de Capsaicina expresada como ppm totales promedio para cada variedad de rocoto, comparando su concentración para valores de muestra de pulpa y semillas respectivamente.

Figura N° 28. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas y muestras de pulpa para las 7 diferentes variedades de rocoto.

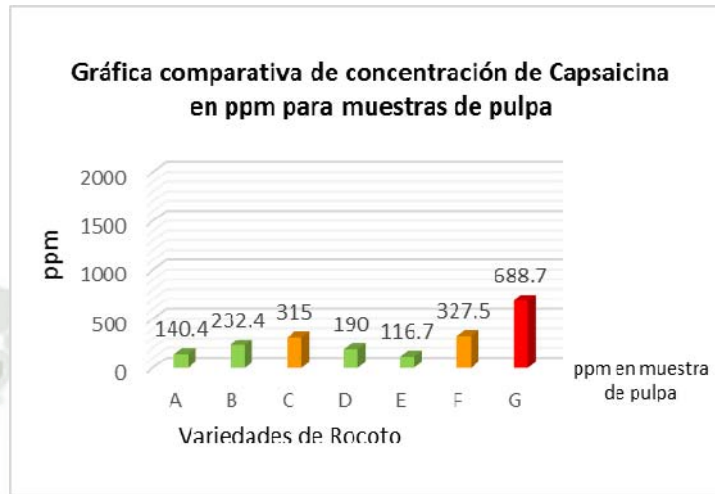


Como podemos observar en la tabla N° 39, se demuestra que entre todas las variedades analizadas, existe una gran disparidad en la concentración de Capsaicina que presentan.

Los resultados nos muestran que la menor cantidad de Capsaicina en fruto se da en rocotos de coloración verde, para la variedad E tenemos un promedio de 116.6 ppm, la cual es la mínima concentración hallada en este estudio para muestras de pulpa. Seguida por 190.0 ppm de promedio para la variedad D, 232.4 ppm para la variedad B y 140.4ppm para la variedad A, todas estas con coloración de fruto verde.

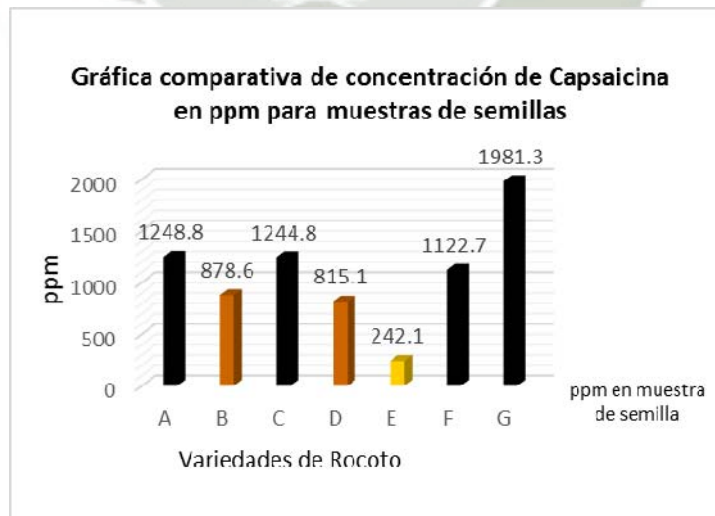
Estos datos pueden ser apreciados en la gráfica de la figura N°29.

Figura N° 29. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de pulpa para las 7 diferentes variedades de rocoto.



El contenido de Capsaicina para muestras de pulpa se incrementa en rocotos de coloración naranja, con 315.0 ppm para la variedad C y 327.5 ppm de Capsaicina para la variedad F. Finalmente la mayor concentración de Capsaicina se la en la variedad G con 688.7 ppm en rocotos de coloración rojo oscuro. No se observó ninguna relación entre el número de lóculos de los rocotos y su contenido de Capsaicina.

Figura N° 30. Grafica comparativa de la concentración de Capsaicina expresada en ppm entre muestras de semillas para las 7 diferentes variedades de rocoto.



En cuanto a la concentración de Capsaicina en muestras de semillas, si se encuentra relación, las semillas de coloración negra correspondientes a las variedades A, C, F y G son las que muestran mayor concentración de Capsaicina con 1981.3 ppm, 1248.8 ppm, 1244.8 ppm y 1122.7 ppm respectivamente. Estos resultados son seguidos por las concentraciones en semillas de coloración marrón correspondientes a las variedades B con 878.6 ppm y la variedad D con 815.1 ppm. Finalmente la menor concentración se da en semillas de color amarillo obscuro pajoso correspondiente a las variedad E mostrando 242.1 ppm de concentración de Capsaicina.

La menor concentración de Capsaicina en semillas se presentó en semillas amarillo obscuro pajoso para la variedad E, en esta variedad el contenido de Capsaicina en fue muy bajo. Por lo cual sabemos que en este caso, a pesar que todas las muestras fueron sembradas en la misma fecha y contaron con las mismas condiciones climáticas y de suelo, en esta variedad el proceso de maduración del fruto requería más tiempo, ya que las semillas nos indican un estado de fruto inmaduro.

Los rocotos con mayor contenido de Capsaicina en semillas y frutos fueron los de la variedad G, los cuales tienen como características principales presentar color rojo, contar con 3 números de lóculos, 45 semillas como promedio por cada fruto y estas eran de color negro. Estas muestras presentaron 688.7 ppm para muestra de pulpa y 1981.3 ppm para muestra de semillas.

4.1.6 Discusiones

F. Nuez y colaboradores dicen es su estudio de 1996 que el contenido de Capsaicina es mayor en la placenta del fruto, principalmente en el septo, donde células de la epidermis se transforman en glándulas ricas en esta sustancia. La formación de Capsaicina se inicia a los pocos días de cuajado el fruto, alcanzando el mayor contenido al momento de maduración. Variedades dulces se consideran cuando el contenido de capsaicinoides está por debajo de 10 ppm, que es el límite para que las papilas gustativas humanas pueden detectar el sabor picante. La formación de Capsaicina es mayor a temperatura elevadas (30 C°) que a temperaturas suaves (21 – 24 C°).⁽¹¹⁾

Otros estudios indican que el contenido de Capsaicina depende de la variedad y de la interacción genotipo por ambiente y el ambiente en que la planta se desarrolla. ⁽¹¹⁶⁾
(57)

Las temperaturas a la que fueron cultivadas las variedades de rocoto fueron suaves, la temperatura mínima fue de 5 °C, temperatura media anual de 15.70 °C y máxima de 26 °C.

Asimismo B. Pickersgill. Al igual que F Nuez, afirman que las semillas del *C. Pubescens* tienen una coloración de marrón a negras, las semillas negras del rocoto son únicas en el género *Capsicum*. ⁽⁹⁹⁾,⁽¹¹⁾

En este estudio se observó diferentes colores de semillas para rocotos, colores como son amarillo oscuro paja, marrón, y negras; el contenido de Capsaicina relacionado a estos colores va en orden ascendente desde el color más claro con la menor concentración de Capsaicina, al más oscuro con la mayor concentración de este compuesto en semillas negras.

Los resultados obtenidos en este estudio nos demuestran que el mayor contenido de Capsaicina se encuentra en las muestras de semillas, postura que es totalmente contraria a un estudio realizado en 1979 donde se estudió la estructura celular de la placenta mediante un microscopio observando que se producían ciertos cambios morfológicos en el tejido epidérmico de la placenta durante la maduración. Parecía ser por tanto que las células epidérmicas de la placenta son el lugar de acumulación de los capsaicinoides. La pequeña cantidad de capsaicinoides detectada en el pericarpio del fruto y en las semillas se le atribuyo a la adherencia de pequeñas cantidades de capsaicinoides procedentes de la placenta. ⁽²⁶⁾

Las concentraciones de capsaicinoides en las variedades picantes de frutos del genero *Capsicum* varían muy significativamente unas de otras. Las variedades poco picantes de pimientos tienen concentraciones de capsaicinoides que van desde los 0,003 % a 0,01 % en peso de fruto. Las concentraciones de capsaicinoides de las variedades picantes suaves van desde 0,01 % a 0,3 %, y las variedades fuertemente picantes se caracterizan por tener un contenido superior al 0,3 % en capsaicinoides del peso total, pudiendo llegar a alcanzarse hasta el 1 %. ⁽¹⁹⁾

En cuanto a porcentajes, analizando los resultados de la tabla N° 39, observamos que se tiene 0.01167 % para el menor resultado de concentración de Capsaicina encontrado correspondiente a la muestra de pulpa con coloración verde correspondiente a la variedad E y el valor máximo de 0.19813 % para el mayor resultado de concentración de Capsaicina encontrado correspondiente a la muestra de semilla color negro de la variedad G. Se cuenta entonces con valores que van de 0.01167 % a 0.19813%, resultados que demuestran que el rocoto se clasificaría como un fruto del genero Capsicum ligeramente picante.



CONCLUSIONES

1. Se logró determinar cualitativa y cuantitativamente la existencia Capsaicina en 7 variedades de *Capsicum pubescens* “Rocoto”, seleccionadas del Instituto Nacional de Innovación Agraria nativas de la localidad de Arequipa, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Performance.
2. Se logró identificar morfológicamente la especie vegetal nativa mediante descriptor IPGRI para *Capsicum spp.* Para cada una de las 7 variedades de *Capsicum pubescens* “Rocoto”.
3. Se demostró que la extracción asistida por ultrasonido es un método eficiente, confiable y adecuado para la extracción de Capsaicina. Se determinó tener las mejores condiciones de extracción de Capsaicina para *Capsicum pubescens* empleando como solvente metanol en relación 1:10, durante 20 minutos a una temperatura de 25 C°.
4. Se demostró que el HPLC es un método adecuado para la determinación y cuantificación de Capsaicina en *Capsicum pubescens*; contando con un sistema isocrático, compuesto por metanol-agua (en proporción 68% 32% respectivamente), a una longitud de onda de trabajo de 280nm, a una temperatura de columna de 45 C° y empleando un flujo de 1mL/min. En estas condiciones se obtuvo un método rápido de separación y análisis de Capsaicina para *Capsicum Pubescens*, el cual demostró ser lineal, sensible y preciso; contando con un límite de detección de 1.26 ppm y un límite de cuantificación de 1.00 ppm.
5. Se logró determinar la proporción promedio de Capsaicina de las 7 variedades de “Rocoto”, *Capsicum pubescens* nativas de la localidad de Arequipa tanto como para muestras de pulpa y como para semillas.
6. Los valores de capsaicina reportados para muestras de pulpa varían en un rango comprendido entre 116.7 ppm y 688.7ppm. Asimismo los valores de capsaicina reportados para muestras de semillas varían en un rango comprendido entre 242.1ppm y 1981.3ppm. Demostrando que las 7

variedades de *Capsicum pubescens* tienen contenido de Capsaicina distintos.

RECOMENDACIONES

1. Se debería de realizar un monitoreo a lo largo del año en los extractos para poder tener una visión de cómo se comporta la concentración tanto en cada una de las estaciones, como en cada una de las etapas de madurez del fruto de *Capsicum pubescens*.
2. La extracción de cada una de las muestras de las variedades debe ser en el menor tiempo posible después de tomadas las muestras para poder tener resultados representativos de la muestra tomada.
3. El seguimiento de estos resultados es de vital importancia para la elaboración de programas de financiamiento y asesoramiento técnico y tecnológico.
4. Realizar una caracterización y evaluación de las variedades de *Capsicum pubescens* tomando todas las características evaluadas mediante el descriptor IPGRI.
5. Caracterizar molecularmente usando la técnica de microsátélites, las 7 variedades de *Capsicum pubescens*, para identificar la variabilidad genética entre las variedades.
6. Realizar un estudio que relacione su contenido de Capsaicina en relación a su contenido de vitamina C.

REFERENCIAS

- 1.- S. Kosuge, M. Furuta. "Studies on the pungent principle of *Capsicum*. Part XIV: Chemical constitution of the pungent principle". *Agric. Biol. Chem.* 34, 248-256, 1970.
- 2.- F. Kawabata, N. Inoue, S. Yazawa, T. Kawada, K. Inoue, T. Fushiki. "Effects of CH-19 sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, in decreasing the body weight and suppressing body fat accumulation by sympathetic nerve activation in humans". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2824-2835, 2006.
- 3.- D. J. Bennett, G.W. Kirby. "Constitution and biosynthesis of capsaicin". *Journal of the chemical society c-organic*, 4: 442-446, 1968.
- 4.- J. Waizel-Bucay, R. Camacho. "El género *Capsicum*. Una versión panorámica". Universidad de las Américas puebla. Revista de divulgación científica y tecnológica. Año 16, Número 60, Abril- Junio 2011
- 5.- C.R. Lozada Nue. "Red peruana de alimentación y nutrición, ficha técnica Rocoto". Lima, Enero 2009.
- 6.- H. Popenoe. "Lost crops of the Incas: little-known plants of the andes with promise for worldwide cultivation". Washington, D.C. National Academy Press, 1989.
- 7.- B. Pickersgill. "The archeological record of chilli peppers (*Capsicum spp*) and the secuence of plant domestication in Peru". *American Antiquity* 34:53-61, 1969.
- 8.- L. Perry, R. Dickau, S. Zarillo, L. Holst, D.M. Pearsall, D.R. Piperno, M.J. Berman, et al. "Starch fossils and the domestication and dispersal of chile peppers (*Capsicum spp.*)". In *The Americas*. *Science* 315:986-988, 2004.
- 9.- IPGRI. Descriptores Para *Capsicum (Capsicum Spp.)*. Instituto Internacional De Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Centro Asiático para el desarrollo y la

investigación relativos a los vegetales, Taipéi, Taiwán. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 1995.

10.- B. Pickersgill. "Migrations of chili peppers, *Capsicum* spp. in the americas in: precolumbian plant migration stoned". Harvard University press, Harvard, Massachussts, 105-123, 1984.

11.- F. Nuez, R. Gil, J. Costa. "El cultivo de los pimientos, chiles y ajíes". Ediciones Mindiprensa, 20: 84-140,1996.

12.- J. Jaramillo, M. Lobo. "Rocoto: manual de asistencia técnica de hortalizas". Ministerio de agricultura e instituto agropecuario. 121 – 144, 1982.

13.- Y.Z.P. Sinha. "The somatic chromosomes and meiosis in *Capsicum*". Indian journal genetic plant breeding, 10:36-42, 1950.

14.- B. Pickersgill. "The domestication of chile peppers in: P.J. Ucko E G.W. Dimbleby (Eds) the domestication and exploitation of plants and animals". Duckworth and co, London: 443-450, 1969.

15.- P.W. Bosland, "Capsicums: Innovative uses of and ancient crop". Journal Janick, progress in new crops. Ashs press, Arlintong, 1995.

16.- B. Pickersgill. "Some aspects of interespecific hibritación in *Cpsicum*". IV Euocarpia *Capsicum* meeting, Wageningen 3:2-6, 1980

17.- W.L. Scoville. "Note on *Capsicum*". *J. Am. Pharm. Assoc.* 453-454, 1912.

18.- M. D. Collins, L. Mayer-Wasmund, P.W. Bosland. "Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography". *HortScience* 30,137-139, 1995.

19.- I. Perucka, W. Oleszek. "Extraction and determinacion of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrometry and high-performance liquid chromatography". *Food Chemistry*, 71: 287-291, 2000.

- 20.- J. E. Woodbury. "Determination of Capsicum pungency by high-performance liquid chromatography and spectrophotometric detection". *J. Assoc. Anal. Chem.* 63, 556-558, 1980.
- 21.- C.O. Nwokem, E.B. Agbaji, J.A. Kagbu, E.J. Ekanem. "Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria". *NY Sci.* 3, 17-21, 2010.
- 22.- H. Ruiz López & J. Pavón. "Flora Peruviana, Et Chilensis Prodromus Sive Novorum Generum Plantarum Peruvianarum, Et Chilensium: Descriptiones". *Et Icones*, Madrid, 1794
- 23.- Presidencia Consejo de Ministros del Perú. "Proyecto sierra exportadora 2013, Perfil Comercial Rocoto". Lima, Peru, 2013-2014.
- 24.- F. Velasco. "Recolección y descripción de muestras del género *Capsicum* en las provincias de Satipo (Junin) y San Miguel (Cajamarca)". Cajamarca, Perú, 31 – 35, 1971.
- 25.- L.R. Howard, S.T. Talcott, C.H. Brenes, B. Villalon. "Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum species*) as influenced by maturity". *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (5): 1713- 1720, 2000.
- 26.- I. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwaka. "Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum*". *Agricultural and biological chemistry*, Tokyo, 43: 2493-2498, 1979.
- 27.- R. Schweid. "Hot peppers: the story of Cajuns and Capsicums". Chapel Hill, University of North Carolina Press, 1999.
- 28.- F. Márkus, H.G. Dado, J. Kapitány, P.A. Biacs. "Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors". *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (1): 100-107, 1999.

- 29.- O.C. Zúñiga, F.G. Jiménez, R.M. Gordillo. "Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum L*". Food Chemistry, 90: 109-114, 2005.
- 30.- U. Kidmose, R.Y. Yang, S.H. Thilsted, L.P. Christensen, K. Brandt. "Content of carotenoids in commonly consumed asian vegetables and stability and extractability during frying". Journal of food composition and analysis, 19: 562-571, 2006.
- 31.- S.W. Leonard, K. Hardin, J.E. Leklem. "Vitamin B-6 content of spices". Journal of food composition and analysis, 14: 163-167, 2001.
- 32.- J.M. Navarro, P. Flores, C. Garrido, V. Martinez. "Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity". Food chemistry, 96: 66-73, 2006.
- 33.- J.J. Lee, K.M. Crosby, L.M. Pike, K.S. Yoo, D.I. Leskovar. "Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum spp.*)". Scientia horticulturae, 106: 341-352, 2005.
- 34.- M. Koch, Y. Arango, H.P. Mock, K.P. Heise. "Factors influencing a-tocopherol synthesis in pepper fruits". Journal of plant physiology, 159: 1015-1019, 2002.
- 35.- B. Estrada, M.A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, F. Merino. "Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns". Journal of agricultural and food chemistry, 48 (12): 6234-6239, 2000.
- 36.- P.A. Luning, T. Ebbenhorstseller, T. Derijk, J.P. Roozen. "Effect of hot-air drying on flavour compounds of bell peppers (*Capsicum annuum*)". Journal of the science of food and agriculture, 68: 355-365, 1995.
- 37.- J. López-Hernández, M.J. Oruña-Concha, J. Simal-Lozano, M.E. Vázquez-Blanco, M.J. González-Castro. "Chemical composition of padrón peppers

(*Capsicum Annuum L.*) Grown in Galicia (N.W. Spain)". Food Chemistry, 57: 557-559, 1996.

38.- M. Materska, S. Piacente, A. Stochmal, C. Pizza, W. Oleszek, I. Perucka. "Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum Annuum L.*". Phytochemistry 63, 893-898, 2003.

39.- N. P. Bekker, N.T. Ulchenko, A.I. Glushenkova. "Physicochemical properties and composition of lipids from capsicum annuum seeds". Chemistry on natural compounds, 37: 131-133, 2001.

40.- P.A. Luning, T. De Rijk, H.J. Wichers, J.P. Roozen. "Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) at different ripening stages". Journal of agricultural and food chemistry, 42: 977-983, 1994.

41.- M. Zimmermann, P. Schieberle. "Important odorants of sweet bell pepper powder (*Capsicum annuum cv. annuum*): differences between samples of Hungarian and Moroccan origin". European food research and technology, 211: 175- 180, 2000.

42.- Y. Yazawa, N. Suetome, K. Okamoto, T. Namiki. "Content of capsaicinoids and capsaicinoids-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum L.*) Hybrids Made With "Ch-19 Sweet" As A Parent". Journal of the japanese society for horticultural science, 58: 601-607, 1989.

43.- H.L. Constant, G.A. Cordell. "Nonivamide, a constituent of capsicum oleoresin". Journal of natural products, 59 (4): 425-426, 1996.

44.- P.M.Gannett, D. Nagel, P. Reilly, T. Lawson, J. Sharpe, B. Toth. "Capsaicinoides: su separación, síntesis, y la mutagenicidad". Journal of organic chemistry, 1988.

45.- Niosh. "Capsaicin and dihydrocapsaicin by Ph. D. Tucker, Samuel". Niosh Dpse. Niosh manual of analytical methods, 4th Edition, 2006.

- 46.- M. Contreras-Padilla, E.M. Yahia. "Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity". Journal of agricultural and food chemistry, 46: 2075-2079, 1998.
- 47.- M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F. Merino. "Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits". Journal of agricultural and food chemistry, 41: 1041-1044, 1993.
- 48.- M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, R. Muñoz, A. Ros Barceló, F.C. Merino. "Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase". Journal of food science, 58: 611-613, 1993.
- 49.- M.A. Bernal, A.A. Calderón, M.A. Pedreño, M.A. Ferrer, F.C. Merino, A. Ros Barceló. "A purification of a basic peroxidase isoenzyme from capsicum fruits and the immunoinhibition of its capsaicin oxidation capacity by antibodies raised against horseradish peroxidase". Zeitschrift fur lebensmittel untersuchung und forschung, a food research and technology journal, 199: 240-242, 1994.
- 50.- F.P. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns". Journal of agricultural and food chemistry, 48 (12): 6234-6239, 2000.
- 51.- B. Koop, J. Jurenitsch. "Biosynthesis of capsaicinoids in *Capsicum annuum* l. var. *annuum*. Formation of the fatty acid moiety of the capsaicinoids from l-valina, l-leucina and l isoleucina". Planta Medica, 43: 272-279, 1981.
- 52.- P. Kirschbaum-Titze, C. Hiepler, E. Mueller-Seitz, M. Petz. "Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption". Journal of agricultural and food chemistry, 50: 1264-1266, 2002.
- 53.- K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake. "Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogs, in *Capsicum annuum* var.

annuum cv. karayatsubusa at different growth stages after flowering”.
Agricultural and biological chemistry, 43: 2493-2498, 1979.

54.- F.P. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. “Identification and quantification of some capsaicinoids in Padron pepper (*Capsicum annum* l. var. *annuum*) fruits”. *Acta alimentaria*, 30: 373-380, 2001.

55.- F.P. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. “Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* l. in relation to fruiting”. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (5): 1188-1191, 2002.

56.- F.P. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. “Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply”. *Scientia horticulturae*, 81: 385-396, 1999.

57.- K.P. Harvell, P.W. Bosland. “The environmental produces a significant effect on pungency of chiles”. *Hortscience*, 32: 1292-1292, 1997

58.- L. Mile, L. Andre. “Determination de capsaicin content of ground paprika”. *Alimentary*. Vol. IV. 1975. Pp. 113-121.2007

59.- O.M.E. Abdel-Salam, J. Szolcsányi, G. Mózsik. “Capsaicin and the stomach, a review of experimental and clinical data”. *Journal of physiology-paris*, 91: 151-171, 1997.

60.- P.W. Bosland, “Peppers vegetable and spice capsicums”. 2nd Ed. Wallingford, Oxfordshire, Cambridge, 2012.

61.- Snyman, M.J. Stewart, V. Steenkamp. “A Fatal case of pepper poisoning”. *Forensic Science International*, 124: 43-46, 2001.

62.- Y.J. Surh, C.R.J. Lee, K.K. Park, S.T. Mayne, A. Liem, J.A. Miller. “Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamates and n – nitrosodimethylamine”. *Carcinogenesis*, 16: 2467-2471, 1995.

- 63.- B. Toth, P. Gannett. "Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice". In Vivo Journal, 6: 59-63, 1992.
- 64.- R. Agrawal, M. Wiessler, E. Hecker, V.S. Vides. "Tumour promoting effects of chilli extract in balb/c mice". International journal of cancer, 38: 689-695, 1986.
- 65.-L. López-Carillo, M.H. Avila, R. Dubrow. "Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case control study". American journal of epidemiology, 139: 263-271, 1994.
- 66.- M.C. Unnikrishnan, R. Kuttan. "Tumor reducing and anticarcinogenic activity of selected spices". Cancer letters, 51: 85- 89, 1990.
- 67.- Y.J. Surh, S.S. Lee. "(Short Review) Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?" Food and chemical toxicology, 34: 313-316, 1996.
- 68.- R. Sancho, C. Lucena, A. Macho, M.A. Calzado, M. Blanco-Molina, A. Minassi, G. Appendino, E. Muñoz. "Immune suppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits nf-kb activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo". European journal of immunology, 32: 1753-1763, 2002.
69. K. Murakami, M. Ito, H.H. Htay, R. Tsubouchi, M. Yoshino. "Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation". Biomedical research-Tokyo, 22 (1): 15-17, 2001.
- 70.- R.M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero, M.A. Dessì. "Antioxidant activity of capsinoids". Journal of agricultural and food chemistry, 50 (25): 7396-7401, 2002.
- 71.- D.E. Henderson, S.K. Henderson. "Termal decomposition of capsaicin. 1. Interactions with oleic acid at high temperatures". Journal of agricultural and food chemistry, 40: 2263-2268, 1992.

- 72.- J. Joo, D. Kim, J. Choi, J. Yun. “Análisis proteómico del potencial anti obesidad de la Capsaicina en el tejido adiposo blanco de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas”. *Proteome Res.* 2010
- 73.- B. Bernstein, S. Phillips. “Application of a topical medication containing high-dose capsaicin (0.25%) in a lidocaine containing vehicle for treatment of painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia”. *The journal of pain*, 7: 60-60, 2006.
- 74.- G.C. Morris, S.J. Gibson, R.D. Helme. “Capsaicin-induced flare and vasodilatation in patients with postherpetic neuralgia”. *Pain Journal*, 63: 93-101, 1995.
- 75.- E. Kaale, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens. “Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid Chromatography”. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 30: 1331-1337, 2002.
- 76.- R.H. Cichewicz, P.A. Thorpe. “The Antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine”. *Journal of ethnopharmacology*, 52: 61-70, 1996.
- 77.- J. Molina-Torres, A. García-Chávez, E. Ramírez-Chávez. “Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in mesoamerica: affinin and capsaicin”. *Journal of ethnopharmacology*, 64: 241-248, 1999
- 78.- M. Careaga, E. Fernández, L. Dorantes, L. Mota, M.E. Jaramillo, H. Hernandez-Sanchez. “Antibacterial activity of capsicum extract against *salmonella typhimurium* and *pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat”. *International journal of food microbiology*, 83: 331-335, 2003.
- 79.- D.Y. Graham, S.Y. Anderson, T. Lang. “Garlic or jalapeño peppers for treatment of helicobacter pylori infection”. *American journal of gastroenterology*, 94: 1200-1202, 1999.

- 80.- C.S. Kim, T. Kawada, B.S. Kim, I.S. Han, S.Y. Choe, T. Kurata, R. Yu. "Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting ikb-a degradation in lps-stimulated peritoneal macrophages". *Cellular Signalling*, 15: 299-306, 2003.
- 81.- J.S. Park, M.A. Choi, B.S. Kim, I.S. Han, T. Murata, R. Yu. "Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats". *Life science*, 67: 3087-3093, 2000.
- 82.- K. Hyder. "Is Cs The Wrong Solution?" *New Scientist*, 149 (2003): 12-13, 1996.
- 83.- C.A. Reilly, D.J. Crouch, G.S. Yost, A.A. Fatah. "Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in selfdefense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of chromatography*, 912: 259-267, 2001.
- 84.- H. Kato-Noguchi, Y. Tanaka. "Effects of capsaicin on plant growth". *Biologia plantarum*, 47: 157-159, 2003.
- 85.- W.F. Andelt, K.P. Burnham, D.L. Baker. "Effectiveness of capsaicin and bitrex repellents for deterring browsing by captive mule deer". *Journal of wildlife management*, 58(2): 330-334, 1994.
- 86.- Y. Zewdie, P.W. Bosland. "Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for capsicum species". *Biochemical systematics and ecology*, 29: 161-169, 2001.
- 87.- M. Willcox, G. Bodeker, P. Rosoavaivo. "Traditional Medicine Plants Analyzed By HPLC". Crc Press. Indiana , United States , 2004
- 88.- F. Rouessac. *Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas*. Mc Graw Hill, 2003.
- 89.- R.C. Weast. *Handbook of Chemistry and Physics*. 60th Ed. Crc Press Inc, Boca Raton, Florida: 1979.

- 90.- H.L. Constant, G.A. Cordell. "Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography". *Journal of natural products*, 58 (12): 1925-1928, 1995.
- 91.- J.P. Walter. "Physics of high-resolution ultrasound - practical aspects". *Radiologic clinics North America*, 23: 3-11, 1995.
- 92.- A. M. Krajewska, J.J. Powers. "Gas chromatography of methyl derivatives of naturally occurring capsaicinoids". *Journal of Chromatography A*, 409: 223-233, 1997.
- 93.- B. Bermejo, J.L. Capelo, A. Mota, Y. Madrid, C. Camara. "Enzymatic digestion and ultrasonication: a powerful combination in analytical chemistry". *Trends in analytical chemistry*, 23: 654-663, 2004.
- 94.- A.V. Filgueiras, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho. "Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwaveassisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry". *Atlanta*, 53: 433-441, 2000.
- 95.- A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. De La Guardia. "Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments". *Analytica chimica acta*, 344: 241-249, 1997.
- 96.- P. Valachovic, A. Pechova, T.J. Mason. "Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction". *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 111-117, 2001.
- 97.- D.R. Banjoo, P.K. Nelson. "Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments". *Journal of chromatography a*, 1066: 9-18, 2005.
- 98.- M. Padilla, M. Palma And C.G. Barroso. "Determination of phenolics in cosmetic creams and similar emulsions". *Journal of chromatography A*, 1091: 83-88, 2005.

- 99.- D. A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis. “Coupling of headspace solid phase microextraction with ultrasonic extraction for the determination of chlorinated pesticides in bird livers using gas chromatography”. *Analytica Chimica Acta*, 573-574: 223-230, 2006.
- 100.- Y. Zuo, L. Zhang, J. Wu, J.W. Fritz, S. Medeiros, C. Rego. “Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations”. *Analytica chimica acta*, 526: 35-39, 2004.
- 101.- M.C. Herrera, M.D. Luque De Castro. “Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection”. *Journal of chromatography A*, 1100: 1-7, 2005.
- 102.- R. Karnka, M. Rayanakorn, S. Watanesk, Y.Vaneesorn. “Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoids compounds using the simplex method”. *Analytical Sciences*, 18: 661-665, 2002.
- 103.- H.G. Daood, V. Illés, M.H. Gnayfeed, B. Mészáros, G. Horváth, P.A. Biacs. “Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane”. *Journal of supercritical fluids*, 23: 143-152, 2002.
- 104.- M.A. Rostagno, M.Palma, C.G. Barroso. “Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones”. *Journal of chromatography A*, 1012: 119-128, 2003.
- 105.- C. Caili, T. Haijun, L. Quanhong, C. Tongyi, D. Wenjuan. “Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace”. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 511-516, 2006.
- 106.- M. Palma, C.G. Barroso. “Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products”. *Analytica z* 458: 119-130, 2002.

- 107.- G.F. Barbero, M. Palma, C.G. Barroso. "Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers". *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 3231-3236, 2006.
- 108.- R.I. Santamaría, M.D. Reyes-Duarte, E. Bárzana, D. Fernando, F.M. Gama, M. Mota, A. López-Munguía. "Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annum L.*) Using ethanol as solvent". *Journal of agricultural and food chemistry*, 48: 3063-3067, 2000.
- 109.- F.P. Estrada, J. Díaz, F. Merino, M.A. Bernal. "Effects of mineral fertilizant supplementation on fruit development and pungency in Padron peppers". *Journal of horticultural science & biotechnology*, 73: 493-497, 1998.
- 110.- T.H. Cooper, J.A. Guzinski, and C. Fisher. "Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in capsicum oleoresins. *Journal Agr. Food Chem.* 39:2253–2256, 1991.
- 111.- A. Kurian, A. Starks. "HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chili peppers". *Journal food science*. No.67. Pp.956-962, 2002.
- 112.- Z.A. Othman, Y.B. Ahmed, M.A. Habila, A.A. Ghafar. "Determination of Capsaicin and Dihidrocapsaicin in Capsicum fruit samples using High Performance Liquid Chromatography". *Molecules Journal*. 16.8919-8929.2001.
- 113.- V. Attuquayefio, K. Buckle. "Rapid Sample Preparation Method for HPLC Analysis of Capsaicinoids in *Capsicum* Fruits and Oleoresins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35: 777-779, 1987.
- 114.- L. López Martínez, P.L. López De Alba, M. González Leal. "Nuevo método espectrofotométrico de determinación de capsaicinoides en salsas y chiles." *Novena jornada de análisis del conacyt, México*. 1999.
- 115.- D.E. Henderson, A.M. Slickman. "Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of

linoleic acid. A comparative study against bht and melatoin”. Journal of agricultural and food chemistry, 47: 2563-2570, 1999.

116.- Y. Zewdie, and P.W. Bosland. “Pungency of chile (*Capsicum annuum* L.) fruit is affected by node position”. Hort- Science 35:1174, 2000.

117.- J. Miller, J. Miller Jane. “Statistics and chemometrics for analytical chemistry”. 6th Edition, Prentice-Hall, Harlow. 2010

118.- J.A. Osuna-García, M.M. Wall, C.A. Waddell. “Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annuum* L.) Cultivars”. Journal of agricultural and food chemistry, 46 (12): 5093-5096, 1998.

119.- World of Chillies, *Capsicum* from the world. [Acceso el 30 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.worldofchillies.com/Chilli-plant-varieties/Chilli-plant-varieties-Baccatum/Chilli-plants-Capsicum-Baccatum.html>

120.- Harvard University Database Publications, 2014. [Acceso el 27 de junio del 2014]. Disponible en: http://kiki.huh.harvard.edu/databases/publication_search.php?mode=details&id=2851

121.- Scoville scale for all peppers. [Acceso el 30 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.pepperseeds.eu/scoville/>

122.- Scoville scale. Scoville Food Institute [Acceso el 30 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.scufoods.com>

123.- United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Center, 2014. [Acceso el 15 de junio del 2014]. Disponible en: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CAPU38>

124.- Capsaicin. Pubchem. Open chemistry database. National Center for Biotechnology Information, 2014. [Acceso el 22 de junio del 2014]. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548943?from=summary>

125.- Dihidrocapsaicin. Scientific Database Publications, 2014. [Acceso el 25 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/structures/structures/metabolites/HMDB38457>

126.- Dihidrocapsaicin. Pubchem. Open chemistry database. National Center for Biotechnology Information, 2014. [Acceso el 22 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/107982#section=ChEBI-Ontology>

127.- Ciencia Picante. Revista científica Colombiana, 2014. [Acceso el 16 de julio del 2014]. Disponible en: http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_1_4.html Disponible en: <http://huh.harvard.edu/pages/about>

128.- A Capsaicin update “Creams, Sprays, Gels, Sticks, and Compounds. 2014. [acceso el 25 de agosto del 2014]. Disponible en: <http://www.fieryfoods.com>

129.- Instituto Nacional de Innovación Agraria. Lima-Perú, 2014. [Acceso el 25 de junio del 2014]. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe>

ANEXOS

Tabla N° 40. Tabla de parámetros importantes de las muestras de rocoto. Variedades A, B y C.

La tabla N° 40 muestra los parámetros más importantes de las variedades de rocoto, incluyendo fotografías de las muestras embolsadas en bolsas herméticas.

Accesión	Color fruto	Numero de lóculos	Figura
Variedad A	Verde	2	
Variedad B	verde	3	
Variedad C	Naranja	2	

Tabla N° 41. Tabla de parámetros importantes de las muestras de rocoto. Variedades D, E, F y G.

La tabla N° 41 muestra los parámetros más importantes de las variedades de rocoto, incluyendo fotografías de las muestras embolsadas en bolsas herméticas.

Accesión	Color fruto	Numero de lóculos	Figura
Variedad D	verde	3	
Variedad E	Verde	4	
Variedad F	Naranja amarillo	4	
Variedad G	Rojo oscuro	3	



Figura N°31. Vista de las muestras de rocoto embolsadas en bolsas herméticas y pesadas de rocoto entero.



Figura N°32. Pesadas de rocoto entero.



Figura N°33. Patrón de Capsaicina (Sigma-Aldrich)



Figura N°34. Esquema de equipo de filtración de solventes .Vista de filtro de membrana para la filtración de solvente y vista del filtro después de la filtración.



Figura N°35. Vista de homogenización de muestra de pulpa.



Figura N°36. Vista de algunas muestras antes de la extracción asistida por ultrasonido



Figura N°37. Vista de extracción asistida por ultrasonido.

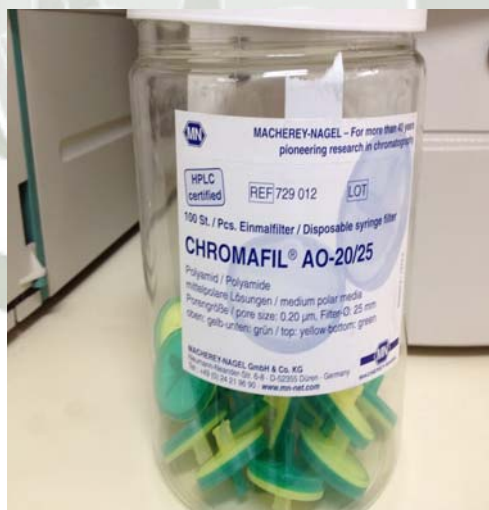


Figura N°38. Filtros de jeringa de 0.45 µm estériles Macherey-Nagel

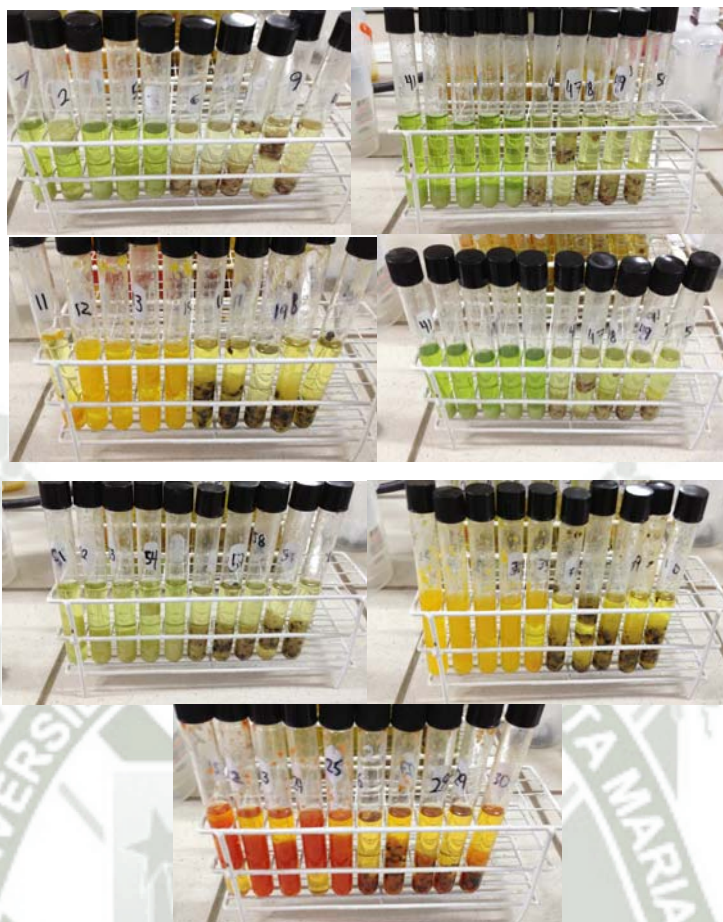


Figura N°39. Vista de algunas muestras de pulpa y semillas posteriores a la extracción asistida por ultrasonido.



Figura N°40. Vista del filtrado de muestras con filtro de jeringa y disposición de muestra en viales.

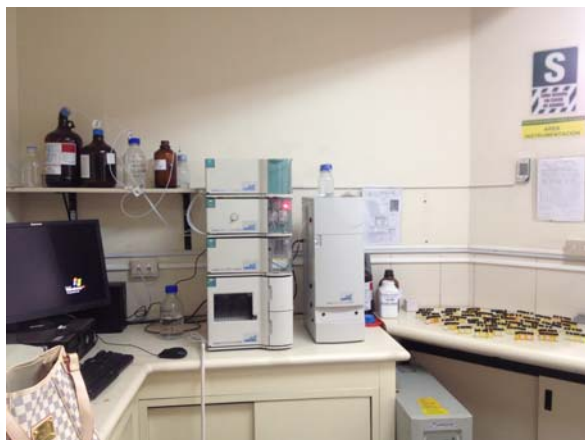


Figura N°40. Vista del equipo de *HPLC* y muestras de extracto de rocoto.



Figura N°41. Vista de los solventes integrados al equipo de *HPLC*.



Figura N°42. Vista general de equipo de *HPLC*.



Figura N°43. Columna cromatográfica integrada al horno del equipo de *HPLC*, empleada para la determinación y cuantificación de Capsaicina.



Figura N°44. Viales de algunas muestras de extractos de rocoto tanto para muestras de pulpa o semillas a ser analizados por *HPLC*.

Tabla N° 42. Tabla de distribución T

V ₂	V ₁																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20							
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0							
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45							
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660							
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803							
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558							
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874							
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445							
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150							
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936							
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774							
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646							
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544							
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459							
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388							
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328							
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276							
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230							
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191							
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155							
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124							

Fuente: Miller James, Miller Jane. (117)



Tabla N° 43. Tabla de valores críticos de f para test de una cola ($p=0.05$)

V ₂	V ₁																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20							
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0							
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45							
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660							
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803							
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558							
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874							
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445							
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150							
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936							
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774							
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646							
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544							
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459							
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388							
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328							
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276							
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230							
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191							
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155							
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124							

Leyenda

V1=grados de libertad del numerador

V2=grados de libertad del denominador

Fuente: Miller James, Miller Jane. (117)

Lachrom elite UV DAD (Offline) Method: capsaicina final.met Data: g\007-12-2013\07-39-49 a.m.-rep2.dat Project: Control de Calidad

Sequence: variedadescaro 1.seq

Run #	Status	Run Type	Level	Conc Override	Custom Parameters	Injps	Vial	Volume (µL)	Sample ID	Method	Filename
209	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	17	101.658		capsaicina final.met	g\6907-12-2013\06-32-26 a.m.-rep2.dat
210	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	18	101.658		capsaicina final.met	g\6907-12-2013\06-43-36 a.m.-rep3.dat
211	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	19	101.658		capsaicina final.met	g\6907-12-2013\06-54-51 a.m.-rep1.dat
212	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	20	101.658		capsaicina final.met	g\6907-12-2013\07-06-03 a.m.-rep2.dat
213	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	21	101.658		capsaicina final.met	g\6907-12-2013\07-17-23 a.m.-rep3.dat
214	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	22	101.670		capsaicina final.met	g\7007-12-2013\07-28-49 a.m.-rep1.dat
215	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	23	101.670		capsaicina final.met	g\7007-12-2013\07-28-49 a.m.-rep2.dat
216	Complete	Summary End	0 n/a		Unconfigured	1	24	101.670		capsaicina final.met	g\7007-12-2013\07-28-49 a.m.-rep2.dat
217	Complete	Begin Calibration	0 n/a		Unconfigured	1	25	10	Capsaicina std 001	capsaicina final.met	capsaicina final.met
218	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	26	10	Capsaicina std 001	capsaicina final.met	capsaicina final.met
219	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	27	10	Capsaicina std 002	capsaicina final.met	capsaicina final.met
220	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	28	10	Capsaicina std 002	capsaicina final.met	capsaicina final.met
221	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	29	10	Capsaicina std 003	capsaicina final.met	capsaicina final.met
222	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	30	10	Capsaicina std 003	capsaicina final.met	capsaicina final.met
223	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	31	10	Capsaicina std 004	capsaicina final.met	capsaicina final.met
224	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	32	10	Capsaicina std 004	capsaicina final.met	capsaicina final.met
225	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	33	10	Capsaicina std 005	capsaicina final.met	capsaicina final.met
226	Complete	Summary Run	0 n/a		Unconfigured	1	34	10	Capsaicina std 005	capsaicina final.met	capsaicina final.met
227	Complete	End Calibration	0 n/a		Unconfigured	1	34	10	Capsaicina std 005	capsaicina final.met	capsaicina final.met

Open data file from the current sequence record.

Inicio ZChrom Elite Lachrom elite UV DAD... CARO ROSA (F) View chromatograms... 12:15 p.m.

Figura N°45. Vista del de una muestra representativa del análisis de Capsaicina Corrida G70 sequence caro variedades, correspondiente a la variedad G.

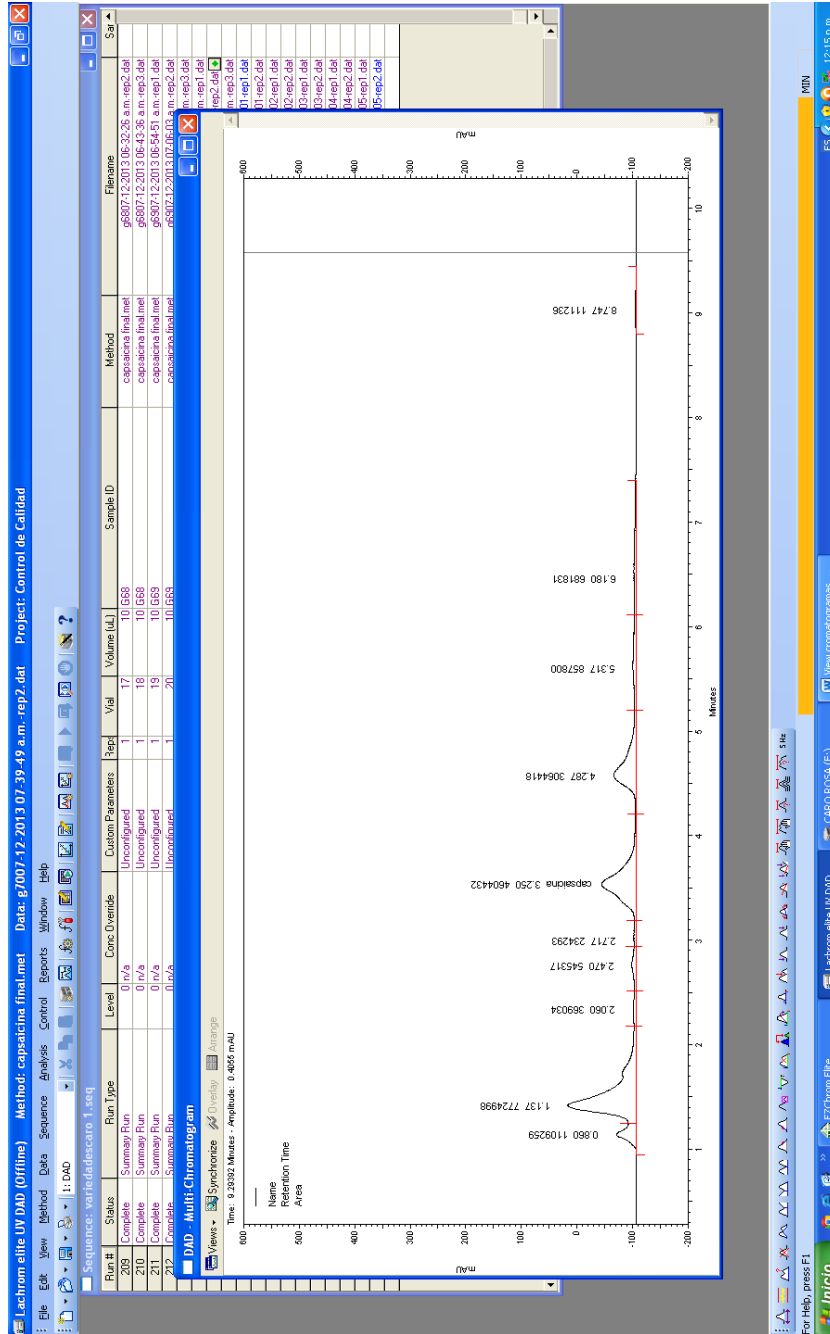


Figura N°46. Vista de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G

En la figura N°46 se muestra la corrida cromatográfica G70 sequece caro variedades, correspondiente a la variedad G, muestra de semilla, la cual mostro mayor cantidad de contenido de Capsaicina. En esta imagen se observa que aparecen otros picos cromatográficos, estos corresponden a ruido, y a otros posibles capsaicinoides contenidos en la muestra.

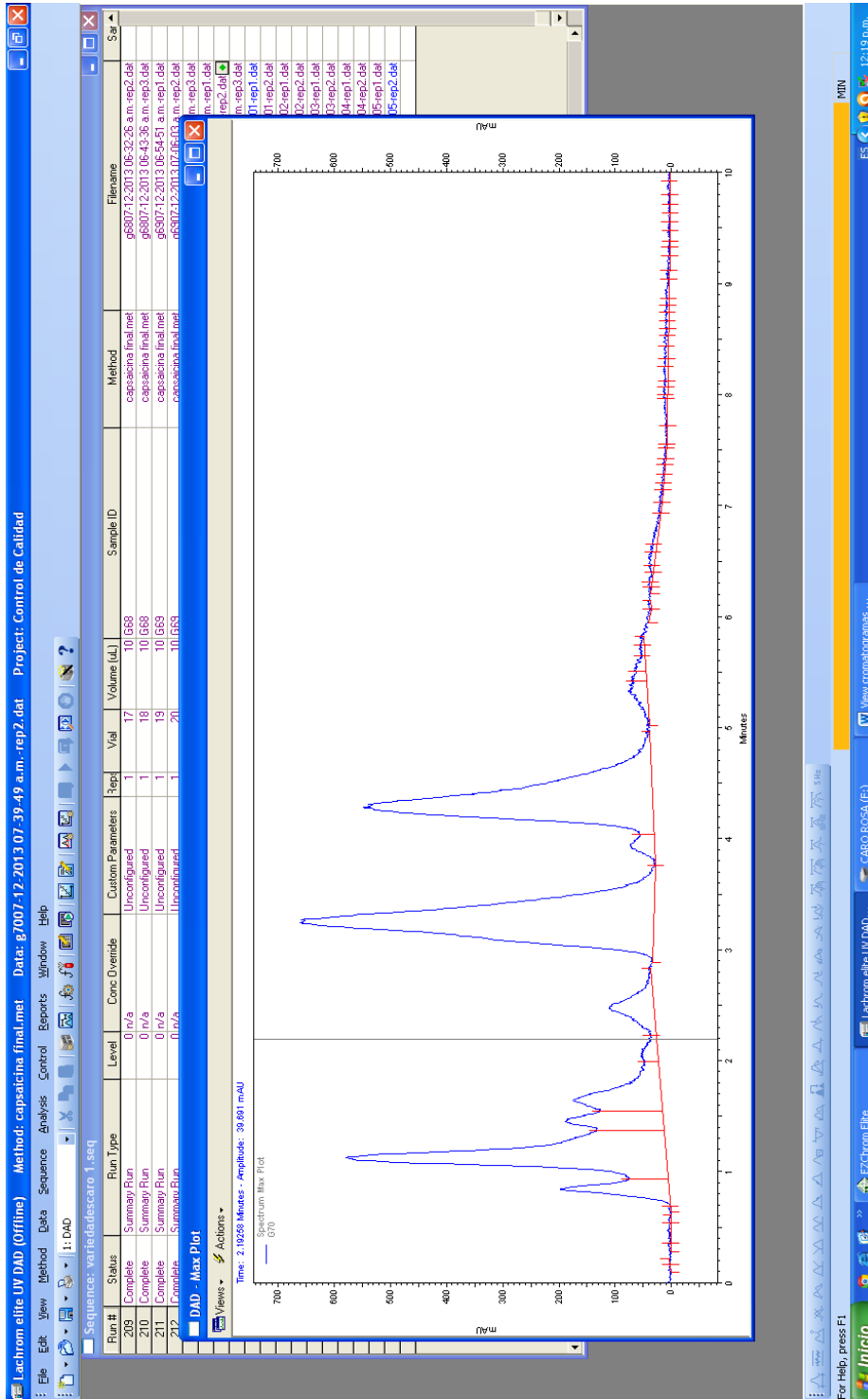


Figura N°47. Vista tipo Max plot de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G.

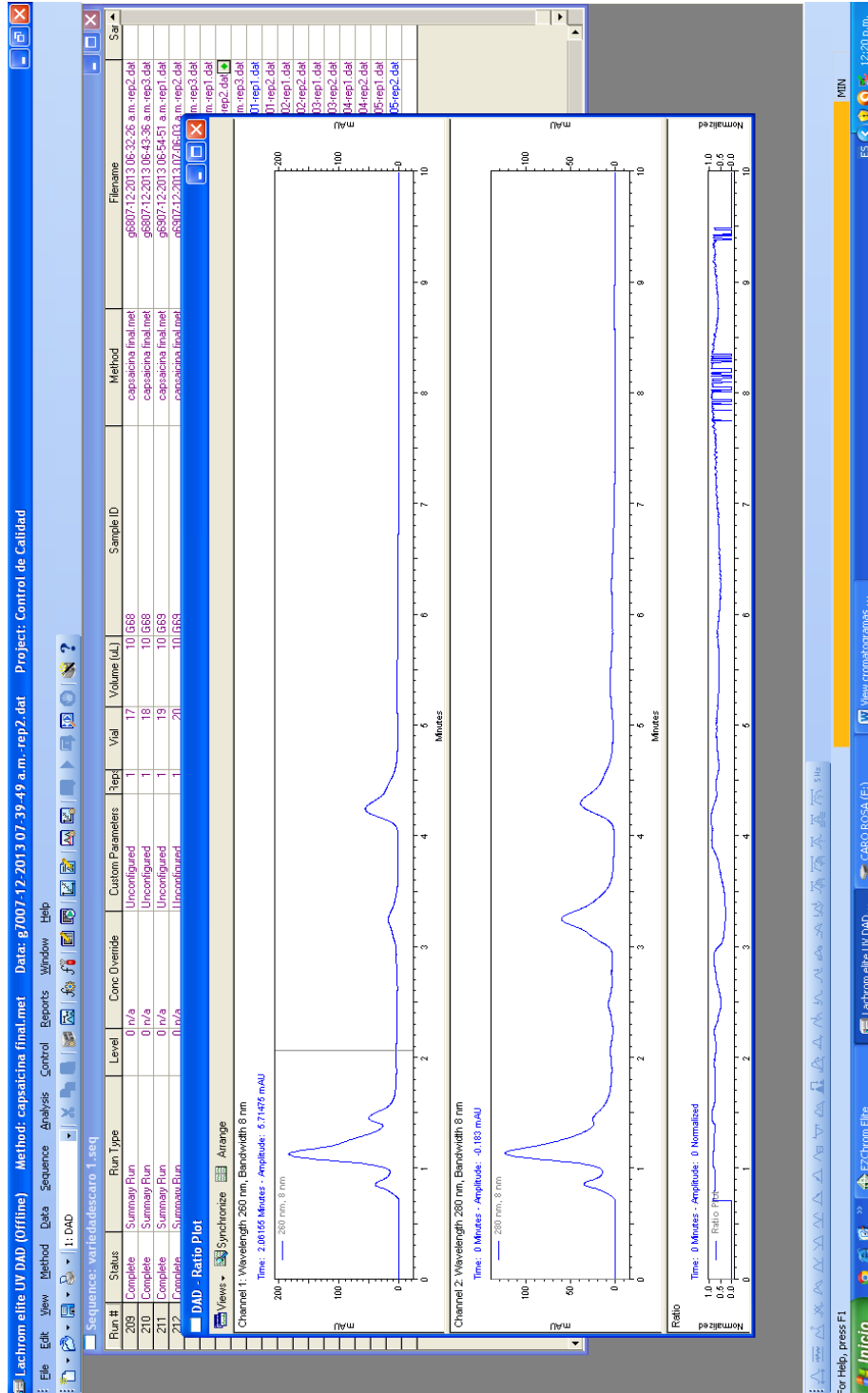


Figura N°48. Vista tipo ratio plot de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G

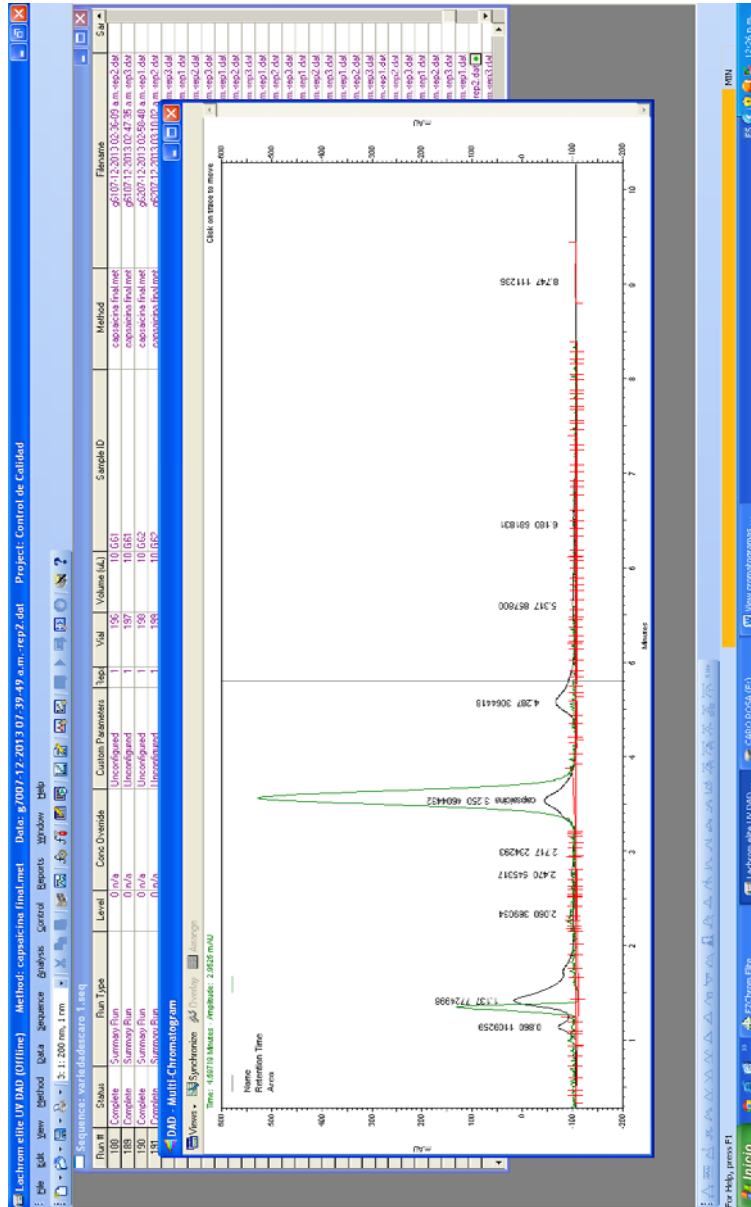


Figura N°49. Vista de la corrida cromatográfica representativa correspondiente a la variedad G con trazo añadido

Vista tipo Añadir trazo ; donde se anade un trazo previamente existente , en este caso el trazo anadido es el de patron de Capsaicina. Se observa la primera curva correspondiente al ruido y la segunda curva correspondiente al patron de Capsaicina, ambas curvas superpuestas de color verde sobre la corrida cromatografica de la muestra representativa correspondiente a la accesion G.

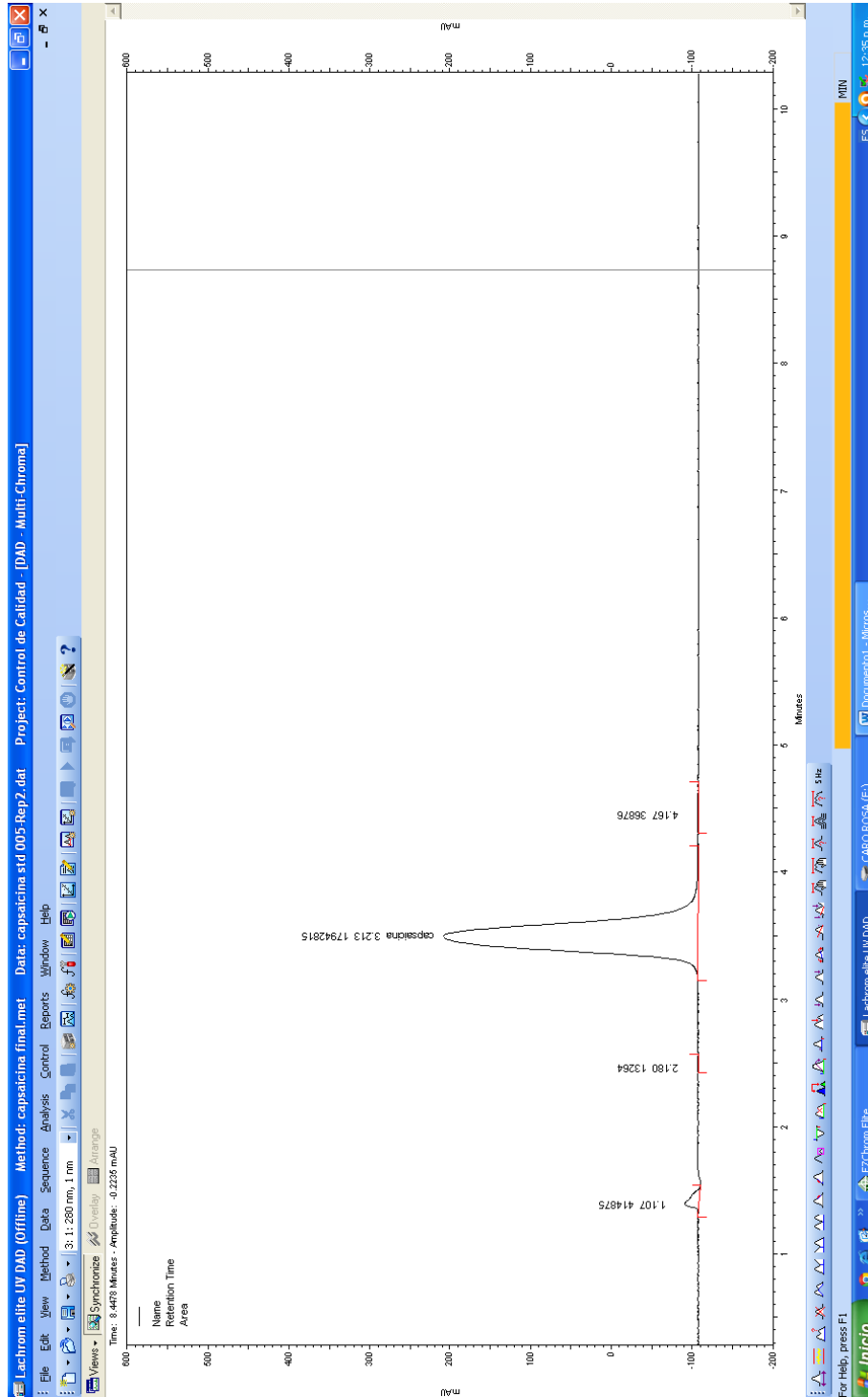


Figura N°50. Vista de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina Reporte guardado con el nombre D:\PROYECTOS HPLC\Control de Calidad\Data\Capsaicina\curva Capsaicina\Capsaicina std 005-Rep2.dat.

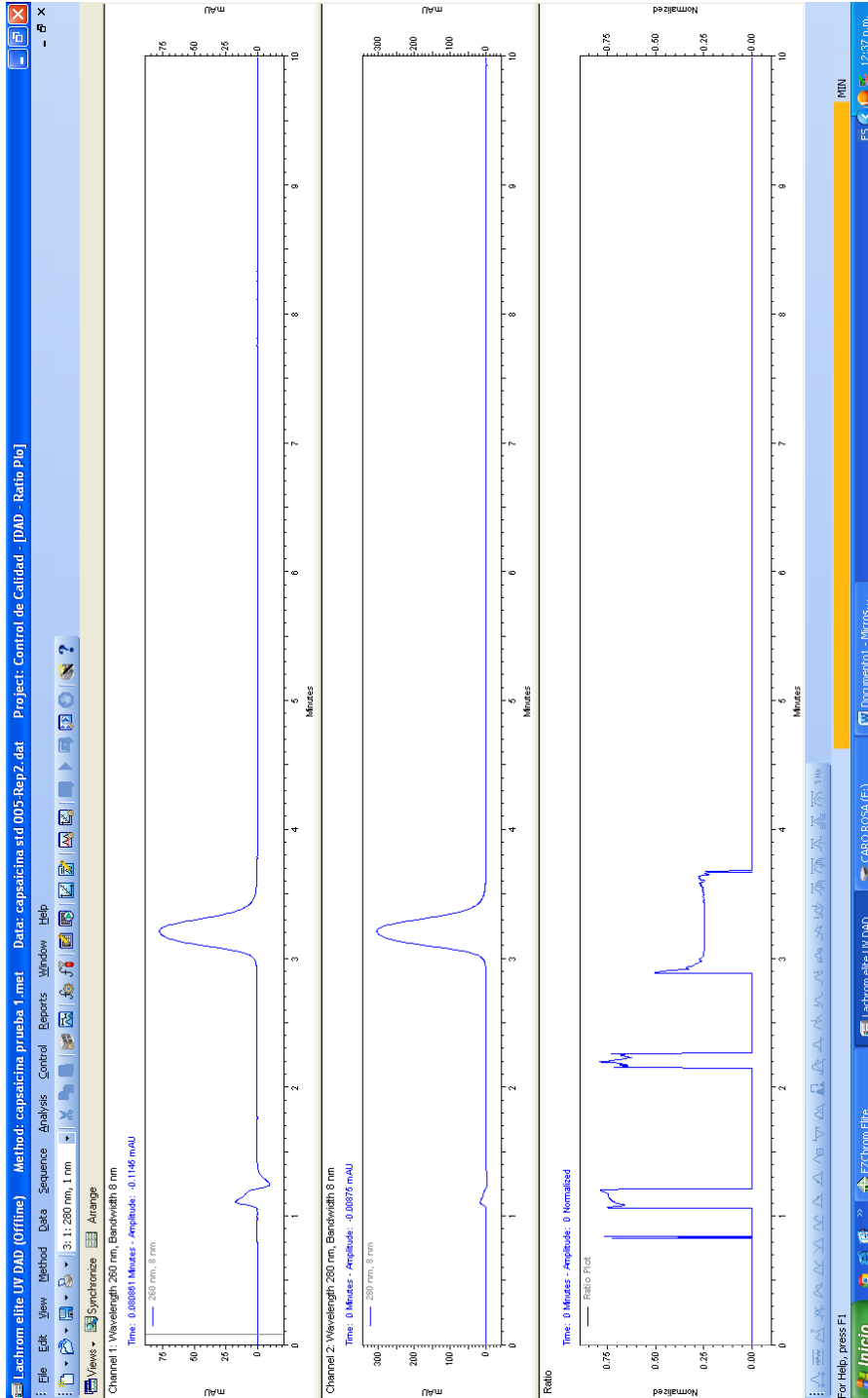


Figura N°51. Vista tipo ratio plot de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina

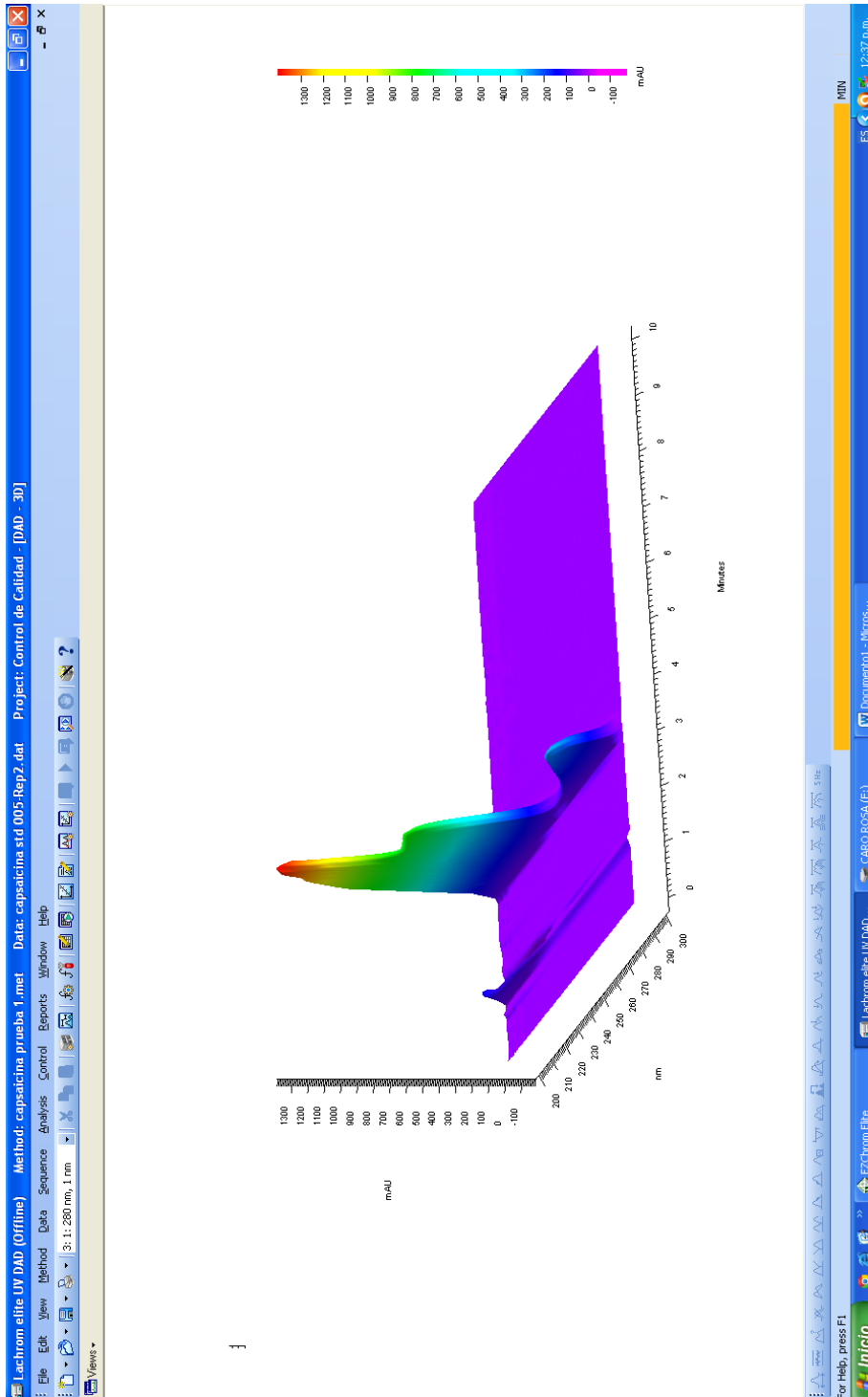


Figura N°52. Vista tipo 3D del barrido espectral del patrón de Capsaicina

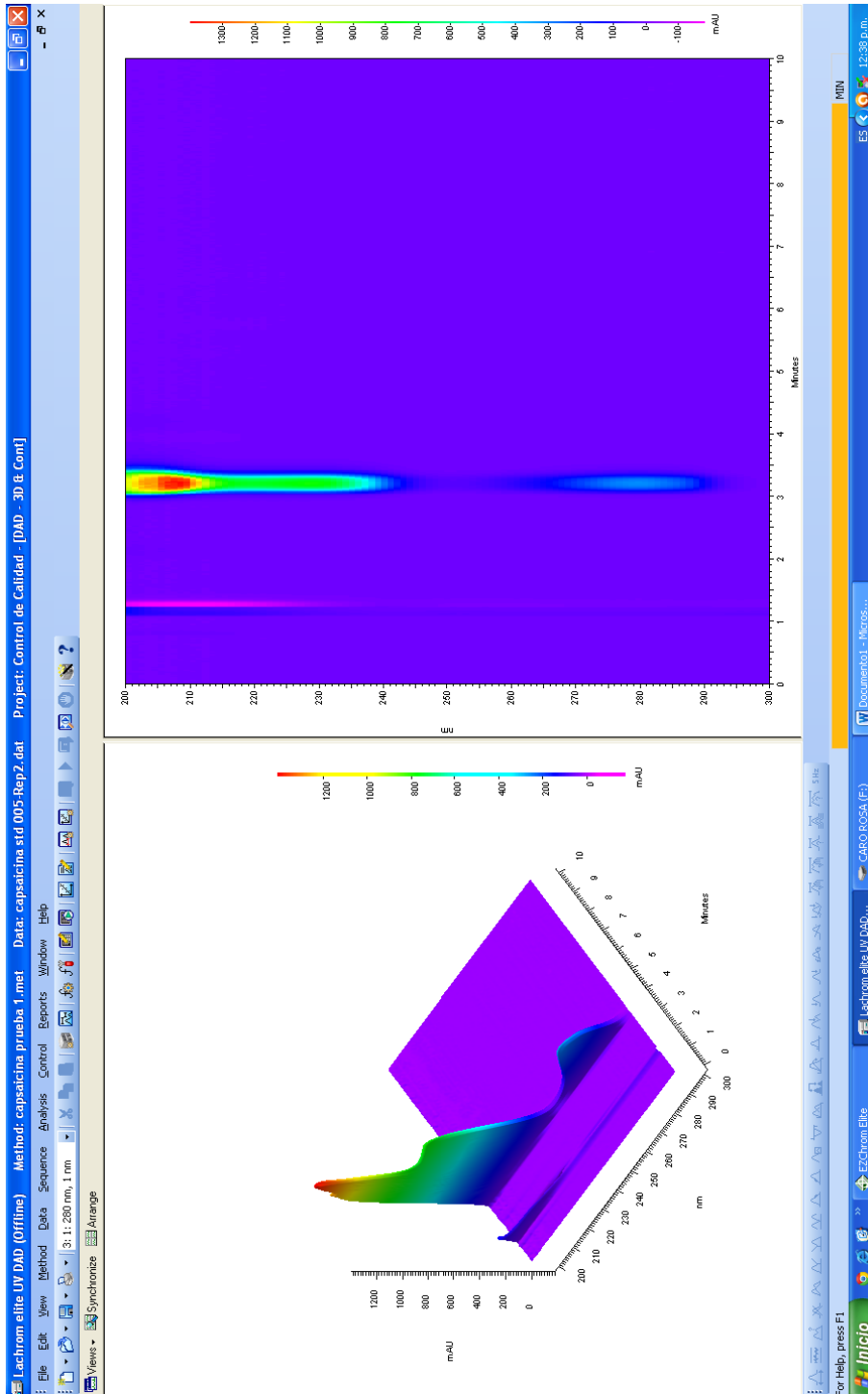


Figura N°53. Vista tipo 3D del barrido espectral del patrón de Capsaicina y absorción de barrido espectral.

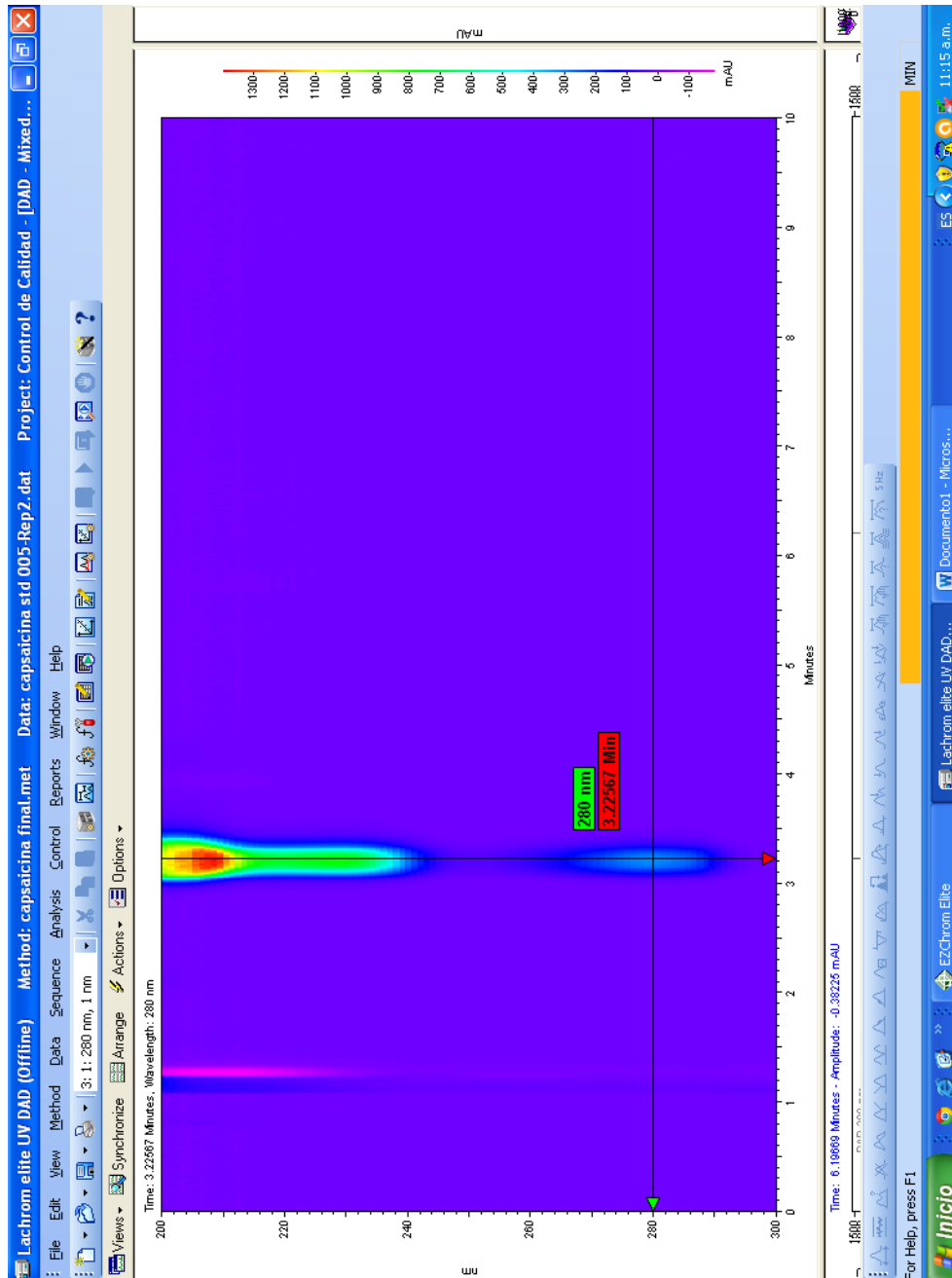


Figura N°54. Vista de absorción del barrido espectral de la corrida cromatográfica del patrón de Capsaicina (280 nm)

Esta figura muestra absorción a 280 nm, sin observar la absorción del otro compuesto.