



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

**SEPARACIÓN DE CAPSAICINA Y DIHIDROCAPSAICINA POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PREPARATIVA.**

Trabajo de titulación para optar al
Título de Técnico Universitario en
Química, Mención en Química
Analítica.

Alumna:

Francisca Urtuvia Cano

Profesor Guía:

Jaime Carmi Karmy

Profesor correferente:

Lautaro Taborga Morales

2023

RESUMEN

KEYWORDS: Oleorresina de Capsicum- Capsaicina- Dihidrocapsaicina- Cromatografía.

El ají es una fruta de plantas pertenecientes al género Capsicum, familia Solanaceae. Es conocido por su sabor muy picante, con algunas excepciones los cuales son denominados como “ajíes dulces” y su alto contenido de capsaicinoides. Dependiendo del tipo de ají, su apariencia suele ser naranja, amarilla, roja o morada. Originario de América Latina, México y América Central, el ají se cultiva ahora en más de 60 países.

El objetivo principal de esta investigación es la obtención de Capsaicina y Dihidrocapsaicina, capsaicinoides presentes en la muestra de oleorresina de Capsicum, mediante cromatografía líquida preparativa. Para ello en primer lugar se tratará la muestra directamente con Acetonitrilo, eliminando de esta manera el material oleoso y algunas impurezas, seguido de esto la muestra se analizará en el equipo de Purificación de PLC utilizando una columna de cromatografía Flash, para obtener la separación de los capsaicinoides. Se analizarán las fracciones obtenidas en este análisis por TLC y posteriormente se enviarán las fracciones de interés a RMN.

Como resultado del presente trabajo de investigación no se obtuvo la completa separación de los capsaicinoides, por lo cual no se pudo cumplir con el objetivo principal, pero si se logró la obtención de tres fracciones significativas, la fracción 62 en la cual se disminuyó la cantidad de capsaicinoides e impurezas, la fracción 63 en la cual se observó un aumento en la concentración de capsaicina y una disminución en la concentración de dihidrocapsaicina (77%-20%) y finalmente la fracción 64 en la cual se logró la mayor concentración de capsaicina disminución de Dihidrocapsaicina (64%-6%). Las cuales fueron analizadas en equipo de HPLC analítico y CG-MS

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	3
SIGLA Y SIMBOLOGÍA	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES	11
1. ANTECEDENTES GENERALES	12
1.1 LOS CAPSICUM	12
1.2 OLEORRESINA DE CAPSICUM.....	12
1.2.1 Los Capsaicinoides	13
1.2.1.1 Capsaicina.....	13
1.2.1.2 Dihidrocapsaicina.....	14
1.2.1.3 Homodihidrocapsaicina	15
1.2.1.4 Nordihidrocapsaicina	16
1.2.1.5 Homocapsaicina	16
1.3 CROMATOGRAFÍA.....	17
1.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	17
1.3.2 Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC)	19
1.3.3 Cromatografía en capa fina (TLC)	20
1.3.4 Cromatografía Líquida Preparativa (PLC)	21
1.3.5 Cromatógrafo acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS).....	22
1.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	23
1.4.1 ¹ H-RMN.....	24
1.4.2 ¹³ C-RMN	26
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO EXPERIMENTAL	27
2 FUNDAMENTO EXPERIMENTAL	28
2.1 MATERIALES Y EQUIPOS.....	28
2.1.1 Equipos.....	28

2.1.2 Materiales	28
2.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	29
2.2.1 Reactivos	29
2.2.2 Soluciones.....	30
2.3 CONDICIONES DE HPLC ANALÍTICO Y PREPARATIVA.....	30
2.3.1 Condiciones HPLC Analítico	30
2.3.2 Condiciones HPLC Preparativa	31
2.3.3 Condiciones CPC-HPLC	31
2.4 PROCEDIMIENTOS	31
2.4.1 Procedimientos para HPLC Analítico.....	31
2.4.1.1 Tratamiento de la muestra	32
2.4.2 Procedimientos para HPLC Preparativo	33
2.4.2.1 Pruebas de Rendimiento de extracción.....	33
2.4.2.2 Tratamiento de la extracción	34
2.4.2.4 Inyección de la muestra en equipo CPC	35
2.4.2.5 Inyección de la fracción obtenida en CPC en equipo de HPLC.....	36
2.4.2.6 Análisis de la oleo resina extraída con CH ₃ CN, en equipo de HPLC preparativa	36
2.5 EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	38
2.5.1. Fórmula utilizada para el porcentaje de rendimiento.....	38
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	39
3 RESULTADOS	40
3.1 RESULTADOS HPLC ANALÍTICO	40
3.1.1 Muestra de oleo resina extraída con Acetonitrilo	40
3.1.2 Resultados Fracción 62	41
3.1.3 Resultados Fracción 63	42
3.1.4 Resultados Fracción 64	44
3.2 RESULTADOS HPLC PREPARATIVA.....	46
3.2.1 Resumen Pruebas de Rendimiento de Extracción	46
3.2.2 Resumen fracciones obtenidas por CPC	47
3.2.3 Resumen fracciones obtenidas de la muestra 56-71	48
3.2.4 Resumen fracciones obtenidas por Flash	49

3.3	RESULTADOS RMN	51
3.3.1	¹ H-RMN Fracción 62	51
3.3.2	¹³ C-RMN Fracción 62	52
3.4	RESULTADOS CG-MS	53
3.4.1	Fracción 62.....	53
3.4.2	Fracción 63.....	54
3.4.3	Fracción 64.....	55
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
	CONCLUSIÓN	58
	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Estructura Química de la Capsaicina.....	14
Figura 1-2: Estructura Química de la Dihidrocapsaicina.....	14
Figura 1-3: Estructura Química de la Homodihidrocapsaicina.....	15
Figura 1-4: Estructura Química de la Nordihidrocapsaicina.....	16
Figura 1-5: Estructura Química de la Homocapsaicina.....	17
Figura 1-6: Diagrama de bloques de los componentes de un típico aparato para HPLC.....	18
Figura 1-7: Equipo de CPC.....	20
Figura 1-8: Cromatografía en capa fina.....	20
Figura 1-9: Sistema de purificación de PLC.....	21
Figura 1-10: Cromatógrafo acoplado a Espectrometría de masas.....	22
Figura 1- 11: Equipo de resonancia magnética nuclear.....	23
Figura 1-12: Representación de moléculas cuando tienen un campo magnético externo aplicado y cuando no lo tienen.....	24
Figura 2-1: Extracciones de la muestra con sus dos fases orgánica y acuosa.....	35
Figura 2-2: Separación muestra de oleo resina en un cartucho Flash.....	37
Figura 3-1: Cromatograma muestra de oleo resina limpiada con Acetonitrilo.....	41
Figura 3-2: Cromatograma de Fracción 62 obtenida por HPLC Flash.....	42
Figura 3-3: Cromatograma de Fracción 63 obtenida por HPLC Flash.....	43
Figura 3-4: Cromatograma de Fracción 64 obtenida por HPLC Flash.....	44
Figura 3-5: ¹ H-RMN Fracción 62.....	51
Figura 3-6: ¹³ C-RMN Fracción 62.....	52
Figura 3-7: Cromatograma de masas de Fracción 62 obtenida por HPLC Flash.....	53
Figura 3-8: Cromatograma de masas de Fracción 63 obtenida por HPLC Flash.....	54
Figura 3-9: Cromatograma de masas de Fracción 64 obtenida por HPLC Flash.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1: Resumen rendimiento de extracción con CH₃CN.

Tabla 3-2: Resumen rendimiento de extracción con CH₃OH.

Tabla 3-3: Resumen fracciones obtenidas por CPC.

Tabla 3-4: Resumen fracciones obtenidas de la muestra 56-71.

Tabla 3-5: Resumen fracciones obtenidas por cromatografía Flash.

SIGLA Y SIMBOLOGÍA

- **CCF** : Cromatografía en capa fina.
- **PLC** : Cromatografía Líquida Preparativa.
- **HPLC** : Cromatografía Líquida de Alta eficiencia.
- **CPC** : Cromatografía de Partición Centrifuga.
- **CCC** : Cromatografía en Contra Corriente.
- **GC/MS** : Cromatógrafo acoplado a Espectroscopia de Masas.
- **RMN** : Resonancia Magnética Nuclear.
- **UV** : Ultravioleta
- **g** : Gramos
- **mL** : Mililitro.
- **µL** : Microlitro.
- **H₂SO₄** : Ácido Sulfúrico.
- **CH₃CN** : Acetonitrilo.
- **C₆H₁₄** : Hexano.
- **AcOEt** : Acetato de Etilo.
- **CH₂Cl₂** : Diclorometano.
- **min** : Minutos.
- **nm** : Nanómetro.
- **°C** : Grado Celsius
- **CDCl₃** : Cloroformo deuterado.

INTRODUCCIÓN

El Capsicum (ají o pimiento) es un fruto del género de las plantas angiospermas, nativo de zonas tropicales y subtropicales de América. Esta planta produce diferentes metabolitos, de los cuales, los más característicos son los capsaicinoides, estos les confieren el picor o pungencia a los frutos, provocando una sensación de ardor que se percibe al comer, esto se debe principalmente a la presencia de la capsaicina, la dihidrocapsaicina y a otros compuestos capsaicinoides que son sintetizados en los frutos.^[1]

Se han encontrado numerosas aplicaciones de los diferentes extractos de los capsaicinoides, estos van desde el campo de la industria alimentaria, en control biológico, ambiental e incluso algunos casos de interés medicinal y farmacéutica. Diversos estudios del género Capsicum han demostrado que la producción de capsaicinoides puede ser atribuida al genotipo, al ambiente y a la interacción de estos dos.^[2]

Los principales métodos de análisis empleados para el estudio de los capsaicinoides son la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), espectrometría de masas y en algunos casos cromatografía de gases, siendo el método HPLC el más empleado en caracterización del contenido de capsaicinoides en las diferentes variedades de capsicum.

La propuesta de esta investigación se basa en desarrollar un método con el cual poder lograr la separación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina, dos de los capsaicinoides que se encuentran en mayor concentración dentro de la oleo resina de Capsicum.

Para esto se utilizará como método de separación la cromatografía líquida preparativa, utilizando una columna de cromatografía Flash para el análisis, y finalmente se caracterizarán los compuestos obtenidos por técnicas espectroscópicas y cromatográficas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Desarrollar un método con el cual poder lograr la separación de dos capsaicinoides presentes en la Oleo resina de Capsicum, específicamente la Capsaicina y la Dihidrocapsaicina, utilizando para ello la Cromatografía líquida preparativa como método de separación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer y purificar a través del uso de diferentes métodos y solventes el extracto de oleo resina para ser utilizado en el análisis.
2. Establecer condiciones del equipo HPLC analítico, para lograr una óptima separación de los capsaicinoides.
3. Escalar las condiciones utilizadas para la separación de los capsaicinoides en el equipo de HPLC analítico al equipo de PLC preparativo.
4. Caracterizar cada uno de los compuestos obtenidos, por técnicas cromatográficas y espectroscópicas respectivamente.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 LOS CAPSICUM

Los *capsicum* o también llamados ajíes son un género de plantas angiospermas, originarias de las zonas tropicales y subtropicales de América, estas comprenden alrededor de doscientas variedades. La forma de este fruto puede variar entre cúbica, cónica o esférica; su interior se encuentra hueco y dividido en dos o cuatro compartimentos y las semillas se ubican cerca del tallo. ^[1]

La propiedad que separa a los capsicum o ajíes de otros vegetales es un alcaloide denominado capsaicina, una sustancia que no existe en ninguna otra planta. Los capsaicinoides son los encargados de darle el pungente y picor a estos frutos, dentro de los cuales los más importantes y que determinan la pungencia son la capsaicina y la dihidrocapsaicina. La cantidad de capsaicinoides presente en los ajíes varía considerablemente entre especies, e incluso puede llegar a ser distinto entre plantas de la misma especie. ^[2]

1.2 OLEORRESINA DE CAPSICUM

La oleorresina de capsicum es un aceite viscoso de color intenso, con el aroma típico al ají. Es el extracto del fruto fresco, maduro o seco de los pimientos capsicum.

Contiene una mezcla compleja de aceites esenciales, ceras, materiales coloreados y varios capsaicinoides. También contiene ácidos de resinas y sus ésteres, proteínas, aminoácidos, entre otros compuestos. ^[2]

1.2.1 Los Capsaicinoides

Los capsaicinoides están dentro de los compuestos fenólicos, corresponden a las amidas las cuales derivan de los ácidos grasos, estos contienen regularmente entre nueve y once átomos de carbono. Son los componentes químicos responsables del ardor y picor en el ají. Estos han sido únicamente descritos en los frutos de las plantas de Capsicum y se cree que son producidos para proteger a las semillas de los patógenos. Actualmente se atribuye este picor de los ajíes a por lo menos 5 capsaicinoides. ^[3]

Los dos capsaicinoides que se encuentran en mayor proporción en el chile o ají son la capsaicina y la dihidrocapsaicina, las cuales difieren en el grado de insaturación del carbono 9 en la cadena lateral. ^[3]

Los otros capsaicinoides que son la Homodihidrocapsaicina, Nordihidrocapsaicina y la Homocapsaicina difieren tanto en el número de carbonos, así como en el grado de insaturación.

1.2.1.1 Capsaicina

De nombre químico **(E) -8-metil-N-vanilil-trans-6-nonenamida**, es un ingrediente activo de los ajíes o pimientos picantes. La capsaicina en estado puro es un compuesto lipofílico, incoloro e inodoro. Produce una fuerte sensación de ardor en la boca. Su estructura química se puede observar en la figura 1-1.

Representa aproximadamente el 69% del total de capsaicinoides en los ajíes.

- Fórmula molecular: $C_{18}H_{27}NO_3$
- Masa molar: 305,41 g/mol

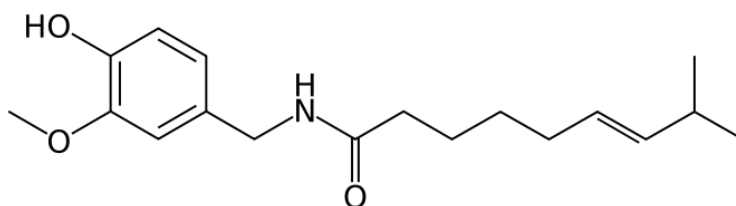


Figura 1-1: Estructura Química de la Capsaicina

Fuente: Elaboración propia.

1.2.1.2 Dihidrocapsaicina

De nombre químico **8-metil-N-vanillilnonanamida** y al igual que la capsaicina es un ingrediente activo de los pimientos picantes o ajíes. Cuando es puro, es un compuesto lipofílico, incoloro, inodoro y cristalino. Su estructura química se puede observar en la figura 1-2.

Representa aproximadamente el 22% del total de capsaicinoides en los ajíes.

- Fórmula molecular: $C_{18}H_{29}NO_3$
- Masa Molar: 307,43 g/mol

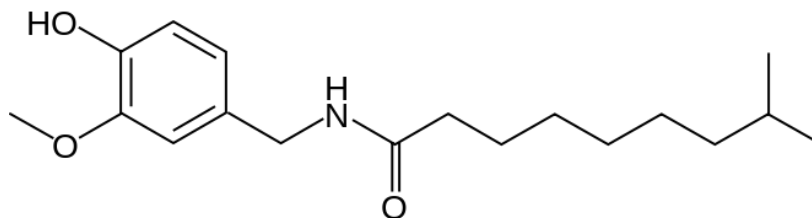


Figura 1-2: Estructura Química de la Dihidrocapsaicina

Fuente: : Elaboración propia.

1.2.1.3 Homodihidrocapsaicina

La Homodihidrocapsaicina de nombre químico **N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-9-methyldecanamida**, es un compuesto de los ajíes, el cual causa una alta irritación, de las más prolongadas debido a su nivel de pungencia y ardor. Su principal característica es que contienen un grupo metoxi que está unido al anillo de benceno que forma el fenol.

Este compuesto, que se puede observar en la figura 1-3, no es soluble en agua y representa aproximadamente el 1% del total de capsaicinoides de los pimientos picantes. Cuando se encuentra en estado de pureza no presenta color y es lipofílico e inodoro. ^[5]

- Formula molecular: $C_{19}H_{31}NO_3$
- Masa molar: 321,45 g/mol.

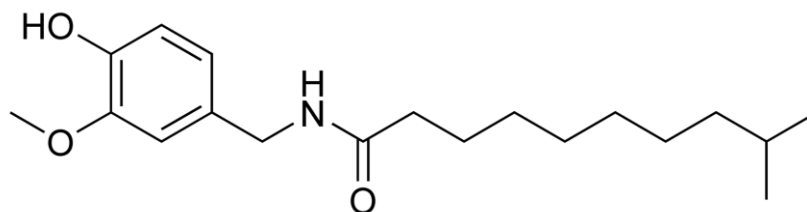


Figura 1-3: Estructura Química de la Homodihidrocapsaicina

Fuente: Elaboración propia.

1.2.1.4 Nordihidrocapsaicina

De nombre químico **N -vanilil-7-metiloctanamida** y al igual que la capsaicina es irritante y representa aproximadamente el 7% del total de capsaicinoides presentes en el ají. Su estructura química se puede observar en la figura 1-4.

- Fórmula molecular: $C_{17}H_{27}NO_3$
- Masa molecular: 293,40 g/mol

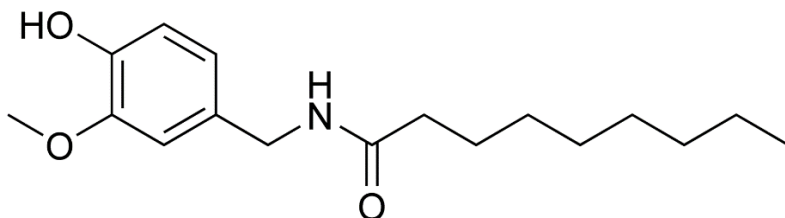


Figura 1-4: Estructura Química de la Nordihidrocapsaicina

Fuente: Elaboración propia.

1.2.1.5 Homocapsaicina

De nombre químico **(6E)-N-(4-Hidroxy-3-metoxibencil)-8-metildec-6-enamida**, es irritante al igual que la capsaicina y representa aproximadamente el 1% del total de capsaicinoides presentes en el ají.

Se ha encontrado en dos formas isoméricas, como se puede ver en la figura 1-5, ambas tienen un doble enlace carbono-carbono en la posición 6 (numerada a partir del carbono amida) en la cadena de acilo de 10 carbonos. Un isómero tiene un carbón adicional y un grupo de metilo en la posición 8, y el otro tiene un grupo de metilo en la posición 9.

- Fórmula molecular: $C_{19}H_{29}NO_3$
- Masa molar: 319,43 g/mol

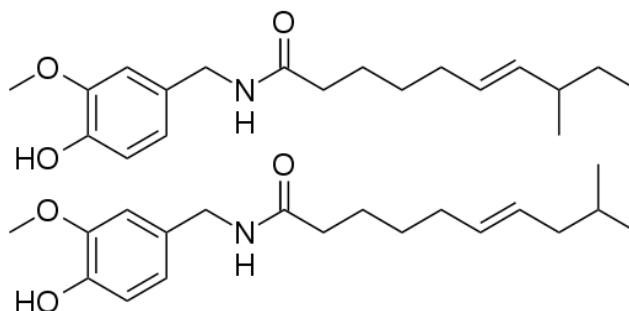


Figura 1-5: Estructura Química de la Homocapsaicina

Fuente: Elaboración propia.

1.3 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método por el cual se pueden separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil* la cual puede ser un gas, un líquido o un fluido. Esta fase móvil se hace pasar por una *fase estacionaria* con la cual es inmisible y que se fija a una columna o superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ambas fases. ^[6]

1.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

La HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan la fase móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. ^[6]

Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. [8]

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido. En la figura 1-6 se puede observar un diagrama de bloques, en el cual se encuentran los componentes típicos de un equipo de HPLC.

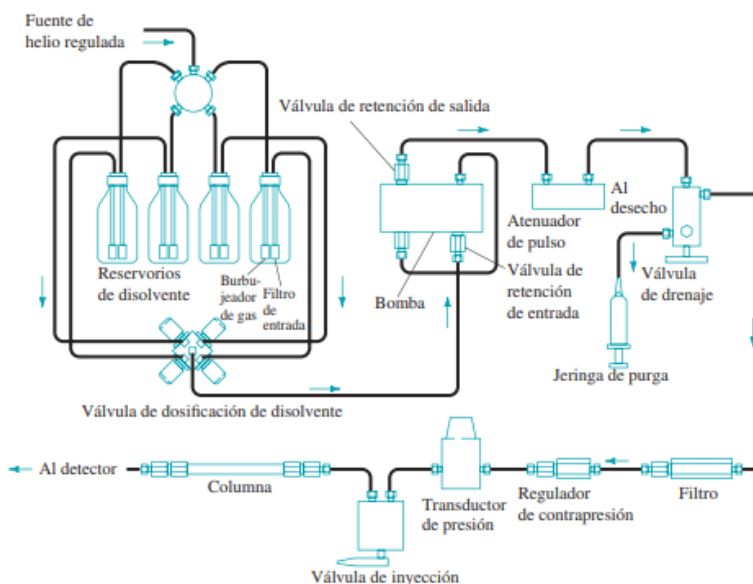


Figura 1-6: Diagrama de bloques de los componentes de un típico aparato para hplc

Fuente: Libro Fundamentos de la Química Analítica Novena edición

1.3.2 Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC)

La Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) es una de las varias técnicas que constituyen la Cromatografía en Contra Corriente (CCC).

Esta técnica funciona basándose en los principios de la cromatografía de partición líquido-líquido: dos fases líquidas inmiscibles entre sí entran en contacto para formar un sistema bifásico que se separa múltiples veces. Los solutos individuales se aíslan en base a los diferentes coeficientes de reparto de cada compuesto en este sistema de doble fase. [14]

Una de las fases líquidas del sistema bifásico se utiliza como fase estacionaria, esta se introduce en la columna (el rotor) , el cual consta de varios discos individuales, los cuales están alineados de tal manera que todas las celdas están en serie para crear varios cientos de etapas de extracción. La fase estacionaria se retiene dentro del rotor por la fuerza centrífuga generada. [15]

La segunda fase se usa como la fase móvil esta es la que contiene la muestra o solutos a extraer, y es introducida a presión en el rotor y se bombea a través de la fase estacionaria. Las fracciones eluidas de la fase móvil y estacionaria se recogen durante un período de varios minutos a horas, estas fracciones, o eluatos, contendrán los solutos purificados individuales. [15]

La selección del sistema apropiado de líquidos para las fases puede ser un problema en la CCC, esto debido a que es necesario seleccionar ambos, es decir, la fase de la “columna” (fase estacionaria) y la fase móvil al mismo tiempo y la primera es dependiente completamente de la otra. [16]

Para ello fue desarrollado un rango de sistemas llamado “Sistema Arizona” con varias proporciones de solventes, haciendo así más fácil esta elección. Este cuenta con 23 variaciones de Heptano/Acetato de Etilo/Metanol/Agua, los cuales están ordenados desde la A hasta la Z. (Revisar anexo A) [16]



Figura 1-7: Equipo de CPC

Fuente: Guía para el usuario, sistema CPC Gilson.

1.3.3 Cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC es una cromatografía abierta que se basa en utilizar una capa plana y fina de un material que se soporte por sí misma (fase estacionaria), sosteniéndola sobre una superficie de vidrio, plástico o metal, como se muestra en la figura 1-8. El funcionamiento de esta es que la fase móvil avanza a través de la fase estacionaria por adhesión y cohesión, siendo ayudada a su vez por la gravedad o por un potencial eléctrico.^[7]

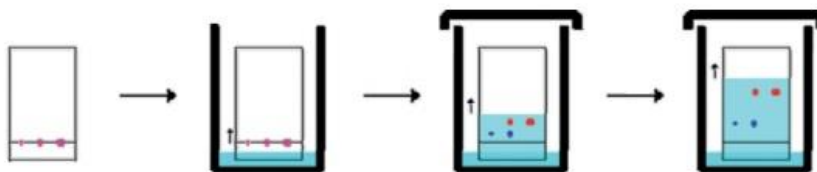


Figura 1-8: Cromatografía en capa fina

Fuente: Principios de cromatografía en capa fina

1.3.4 Cromatografía Líquida Preparativa (PLC)

El sistema de HPLC Preparativo, que se muestra en la figura 1-9, funciona con el mismo principio que un sistema de HPLC Analítico, es decir, lograr la separación de los analitos presentes en la muestra a través de una fase estacionaria (columna) y una fase móvil la cual actúa como portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas (fuerzas intermoleculares) , determinan la separación de los contenidos en la muestra.

La diferencia es que este equipo posee la capacidad de purificar compuestos mediante HPLC preparativa y cromatografía flash en el mismo instrumento, además de contar con sistema de detección UV/VIS con una actualización opcional a un detector de matriz de diodos (DAD) o detección de dispersión de luz evaporativa (ELSD), un sistema de bombeo integrado, colector de fracciones, control de pantalla táctil y el software Gilson Glider Prep.



Figura 1-9: Sistema de purificación de PLC

Fuente: <https://www.gilson.com/plc-purification-systems.html>

1.3.5 Cromatógrafo acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

La Cromatografía de gases (GC) acoplada a Espectrometría, que se muestra en la figura 1-10, ofrece una poderosa técnica analítica que combina la cromatografía como técnica de separación, y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación para compuestos orgánicos/organometálicos.

La Espectrometría de Masas es una potente técnica instrumental de análisis, de alta sensibilidad, basada en la ionización de las moléculas y en la separación y registro de los iones producidos según su relación masa/carga en un sistema a vacío. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es ampliada, procesada y registrada en un ordenador, dando lugar al correspondiente espectro de masas que no es más que una representación gráfica de la abundancia de los iones detectados en función de su relación masa/carga. ^[19]

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma o “TIC” (total ion current). ^[18]



Figura 1-10: Cromatógrafo acoplado a Espectrometría de masas

Fuente: Trabajo de título

1.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas más poderosas con la que cuentan los químicos en la actualidad, para observar estructuras de moléculas, principalmente moléculas orgánicas. Esta técnica proporciona información sobre la estructura molecular a base de examinar las propiedades magnéticas de átomos específicos de las moléculas. ^[10]

Hoy en día son asequibles instrumentos capaces de llevar a cabo espectros de ^1H rutinarios. Los espectros de RMN de algunos otros núcleos también como los espectros de ^{13}C . La combinación de espectros de RMN de ^1H y ^{13}C constituye una herramienta poderosa para investigar los principales átomos que forman parte de las moléculas orgánicas. ^[9]

Al igual que en las espectroscopías de IR, en la RMN se puede utilizar una pequeña cantidad de muestra, la cual es recuperada. ^[11]



Figura 1- 11: Equipo de resonancia magnética nuclear.

Fuente: Introducción a la resonancia magnética nuclear de alta resolución 1D y 2D.

1.4.1 ^1H -RMN

Al igual que los electrones, se considera que los núcleos de los átomos tienen cargas eléctricas y poseen un espín, el cual hace que estos se comporten como si rotaran en torno a su propio eje. El giro de estas partículas cargadas genera un momento magnético, de modo que estos núcleos actúan como pequeños imanes. A este momento magnético, se lo conoce como spin nuclear. ^[10]

Cuando estos núcleos son colocados en un campo magnético externo, adoptan diferentes orientaciones, las cuales corresponden una determinada energía que depende del número de espín, momento magnético y fuerza de campo aplicado. Un núcleo de ^1H o ^{13}C girando puede orientarse de tal manera que su propio campo magnético pequeño se alinea con (paralelo a) o contra (antiparalelo a) el campo externo. ^[9]

En ausencia de un campo magnético externo, los espines de los núcleos magnéticos se orientan al azar, lo anteriormente mencionado puede ser observado en la figura 1-12.

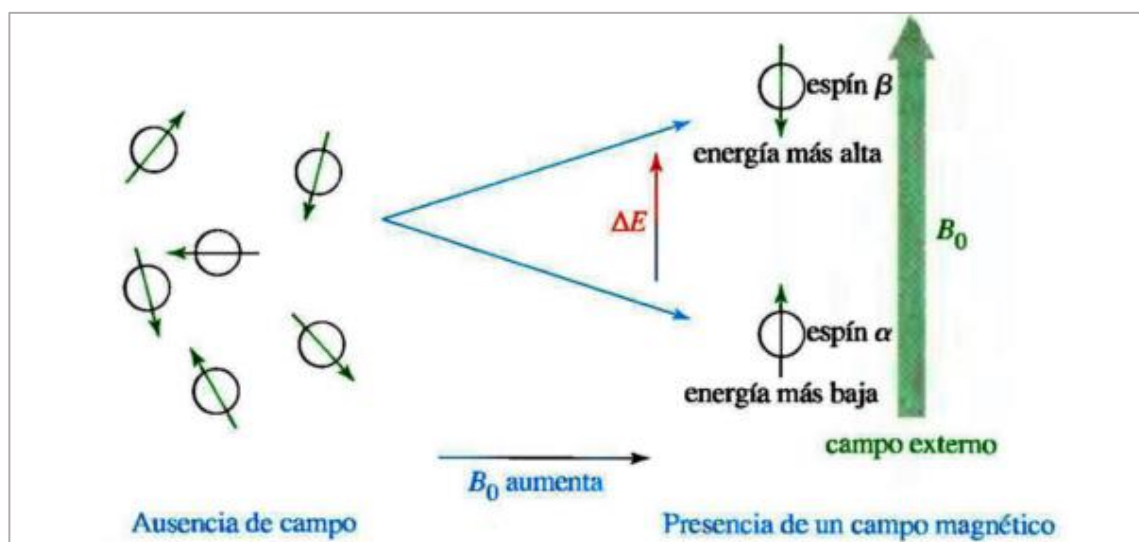


Figura 1-12: Representación de moléculas cuando tienen un campo magnético externo aplicado y cuando no lo tienen.

Fuente: Libro Química Orgánica L.G. Wade.

Para que exista una señal es necesario invertir la orientación del protón, para lo cual deben coincidir la energía necesaria para invertirlo y la radiación proporcionada. esto se logra variando la intensidad del campo magnético externo manteniendo la frecuencia de radiación constante. ^[9]

Si esto fuera todo, la RMN seria de escasa utilidad, ya que todos los protones de una molécula orgánica absorberán a la misma intensidad del campo y el espectro consistiría en una sola banda de absorción. Sin embargo, cuando se aplica a la molécula un campo magnético externo, los electrones que se mueven alrededor de los núcleos aplican por sí mismos pequeños campos magnéticos locales; estos campos magnéticos locales actúan en oposición al campo aplicado de tal manera que el campo efectivo sentido por el núcleo es un poco más débil que el campo aplicado, esto debido a que el campo efectivo depende del ambiente de este (densidad electrónica, presencia de otros protones cercanos, etc.). ^[9]

La frecuencia de resonancia de los protones de un compuesto orgánico depende de que campos magnéticos creados por la circulación de los electrones que están próximos a ellos los protejan o no. Cuando los campos magnéticos inducidos no son opuestos al campo magnético principal, se dice que el protón esta desprotegido, por lo que el campo detectado por el protón disminuye y la señal aparece a campo más bajo. En cambio, si el campo detectado por el protón aumenta, apareciendo la señal a campo más alto. tales desplazamientos de las posiciones de absorción, causadas por la protección o desprotección electrónica, se denomina desplazamiento químico. ^[10]

Para identificar los valores del desplazamiento químico se toma como referencia interna, la señal producida por los protones del cloroformo deuterado.

Por otra parte, la intensidad de las bandas de absorción es directamente proporcional al número de protones que las origina.

1.4.2 ^{13}C -RMN

El espectro de RMN de carbono procede de la resonancia del isótopo ^{13}C del carbono ya que, el isótopo ^{12}C no tiene espín nuclear y no puede verse por RMN. El desarrollo de la RMN del ^{13}C se vio complicado debido a que las señales producidas eran tan débiles que estaban llenas de ruido de fondo, obteniéndose así espectros unas 600 veces menos intensos. ^[9]

La solución a este problema vino con la aplicación de los métodos de transformada de Fourier (FT), en donde se coloca una muestra en un campo magnético de fuerza constante y se irradia un impulso corto de energía que cubre todo el intervalo de frecuencias útiles, registrando así todas las señales simultáneamente. Un ordenador conectado con el espectrómetro realiza entonces el análisis de transformación de Fourier de la señal de sonido. Debido a que se recolectan a la vez todas las señales de resonancia, sólo toma pocos segundos registrar todo el espectro. ^[9]

Los acoplamientos entre núcleos de ^{13}C y los protones de una molécula orgánica son muy amplios y en ellos pueden participar núcleos separados por muchos átomos. Los resultados son espectros de ^{13}C muy complejos y difíciles de interpretar. Este problema puede evitarse desacoplando los protones. ^[10]

Los métodos más comunes son el desacoplamiento “off-resonance” y el desacoplamiento de banda ancha. El método de desacoplamiento “off-resonance”, permite desacoplar todos los protones, exceptuando a los que se hallan unidos al núcleo bajo observación, con los que se pueden observar dobletes, tripletes y cuádrupletes relativamente sencillos. En el desacoplamiento de banda ancha todos los protones de la molécula son irradiados simultáneamente, de forma de que cada tipo de núcleo de ^{13}C produce una señal única. ^[10]

Algunas de las aplicaciones más importantes de la RMN de ^{13}C se hallan en las complejas moléculas de fuentes naturales. ^[10]

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

2 FUNDAMENTO EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1 Equipos

- HPLC, *Agilent Series 1100*; con detector UV/VIS de longitud de onda variable.
- Sistema de purificación de PLC, modelo PLC 2250, Gilson.
- Equipo de Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC).
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, 400; Bruker Avance.
- Cromatógrafo de Gases acoplado a detector de masas; *Agilent Technologies 5975C. inter MSD with Triple-Axis Detector*.
- Equipo para sonicar.
- Estufa, UF 110; Memmert.
- Balanza analítica, BA2204B; Biobase.
- Equipo de Rotavapor, R-100; BUCHI.
- Placa calefactora; Thermo Scientific.
- Cámara UV, CM-10A; Spectroline.
- Centrífuga.
- Baño maría.

2.1.2 Materiales

- Embudo de decantación 100 mL.
- Soporte de embudo.
- Cartucho de cromatografía Flash.
- Vaso de precipitado 100 mL.

- Matraz Erlenmeyer 100 mL.
- Tubos de ensayo
- Jeringa de 20 mL.
- Cápsula de porcelana.
- Embudo analítico con soporte.
- Filtros de jeringa.
- Papel filtro.
- Vial de vidrio 20 mL.
- Tubo de RMN.
- Balones.
- Pipeta Pasteur.
- Pro pipetas.
- Bureta graduada 10 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Micropipeta de 1000 µL.
- Espátula metálica.
- Balón de fondo redondo 100 mL.
- Tubo capilar.
- Cámara para TLC.
- Guantes.
- Pinzas.

2.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES

2.2.1 Reactivos

- Oleorresina con poder pungente de 1.000.000 Shu (Escala Scoville)
- Acetonitrilo, grado isocrático para cromatografía líquida., Merck.

- Metanol, grado isocrático para cromatografía líquida, Merck.
- Etanol, p.a., Merck.
- Acetona
- Hexano, grado isocrático para cromatografía líquida., Merck.
- Acetato de Etilo, p.a., Merck.
- Diclorometano, p.a., Merck.
- Heptano, p.a., Merck.
- Cloroformo deuterado, p.a., Merck.
- Metanol deuterado, p.a., Merck.
- Cloroformo, p.a., Merck

2.2.2 Soluciones

- Ácido sulfúrico 10% v/v H₂SO₄

2.3 CONDICIONES DE HPLC ANALÍTICO Y PREPARATIVA

2.3.1 Condiciones HPLC Analítico

- Flujo: 1.00 mL/min.
- Fase móvil: 50% H₂O, 50% CH₃CN.
- Longitud de onda: 280 nm.
- Temperatura: 35 °C.
- Modo Isocrático.

2.3.2 Condiciones HPLC Preparativa

- Flujo: 55 mL/min.
- Temperatura: 35°C
- Presión: 200 bar.
- Columna cromatografía Flash.
- Fase móvil: comienza con 95% Hexano-5% Acetato de etilo, aumentando gradualmente la proporción de Acetato, hasta alcanzar el 100% de este solvente y finaliza con 100% Metanol.

2.3.3 Condiciones CPC-HPLC

- Fase orgánica: Heptano-Acetato de Etilo (Fase móvil).
- Fase acuosa: Metanol-Agua (Fase estacionaria).
- Presión: 100 bar.
- Sistema Arizona: Q (Heptano(3)-Acetato de Etilo(2)) (Metanol(3)-Agua(2)).
- Λ : 280 nm.
- Volumen inyectado: 12 mL.
- Muestra: 1,2661 g

2.4 PROCEDIMIENTOS

2.4.1 Procedimientos para HPLC Analítico

Antes de poder inyectar la muestra en el equipo esta debió ser previamente tratada, para evitar posibles daños en la columna, esto debido a que la oleo resina posee aceites y otros compuestos que pueden quedar retenidos.

2.4.1.1 Tratamiento de la muestra

- a) Con una pipeta se toman 3 mL de oleo resina y se traspasan a un tubo de ensayo, se agregan 500 μ l de CH_3CN y se deja reposar. Se agrega el mismo volumen de oleo resina a otro tubo, pero esta vez el volumen de solvente agregado es de 200 μ l. A continuación, se llevan los tubos a una centrifuga, para lograr una mejor separación.

El procedimiento anteriormente mencionado es repetido, pero esta vez es usado el metanol como solvente para la extracción de la oleo resina.

Las muestras obtenidas al tratar la oleo resina con los solventes son descartadas, por lo que no son inyectadas en el equipo de HPLC para analizar los capsaicinoides.

- b) En un vaso de precipitado se agregan 6 mL de oleo resina con una pipeta y 3 mL de Metanol, se agita y se deja decantar. La solución sobrenadante es recogida con una jeringa y traspasada a un vaso previamente tarado, la muestra es evaporada a sequedad y reconstituida en 1 mL de CH_3CN .

Se repite el procedimiento previamente descrito, pero esta vez es utilizado únicamente CH_3CN como solvente para la oleo resina y para reconstituir la muestra, esta es traspasada a un vial.

La muestra extraída con Hexano es descartada y la extraída con Acetonitrilo es guardada para ser inyectada en el equipo de cromatografía.

- c) Se toma directamente del frasco con la muestra 1.000 μ l de oleo resina con una micropipeta y se pasa a un tubo de ensayo, se le adicionan 600 μ l de CH_3CN y se agita suavemente por unos segundos, se deja reposar hasta que se logra observar que la muestra se separó en dos fases. La solución sobrenadante recogida con una jeringa y traspasada a un vial para ser guardada y posteriormente inyectada en el equipo.

Con esta solución se procede a probar las condiciones del equipo para lograr una mejor separación de los capsaicinoides.

- d) Para calcular el tiempo muerto se utilizó etanol como muestra, y se mantuvieron las mismas condiciones del equipo utilizadas en las inyecciones de la muestra.
- e) En un vaso de precipitado se pesan 10,02 mL de oleo resina, y se le adicionan 15 mL de CH_3CN se agita y se deja reposar. La solución sobrenadante es recogida y pasada por una columna C18 pequeña, la cual fue previamente activada con 3 mL de CH_3OH y 3 mL de CH_3CN . La solución ya filtrada es posteriormente inyectada por el equipo de HPLC.

2.4.2 Procedimientos para HPLC Preparativo

Antes de comenzar con los análisis en el equipo, la muestra de oleo resina purificada con Acetonitrilo es observada por CCF en C18 y Silica con distintos solventes.

2.4.2.1 Pruebas de Rendimiento de extracción

Para la extracción con Acetonitrilo se toma un vaso de precipitado y se adicionan 20 gramos de oleo resina junto con 20 mL de CH_3CN , esto se lleva a una placa calefactora y se agita durante 15 min a revolución alta. La solución resultante es traspasada a un embudo de decantación, en donde se espera a que se separe en sus dos fases. Cuando ocurre la separación la solución oleosa de color oscuro ubicada en la parte baja del embudo es descartada y pasada a un matraz Erlenmeyer, mientras que la solución sobrenadante es recogida en un balón y llevada a rotavapor para eliminar el solvente, una vez secada la muestra esta es guardada. El proceso previamente descrito es repetido 3 veces, obteniéndose así 4 balones con muestra purificada.

Para la extracción de la oleo resina con metanol se utiliza el mismo procedimiento anteriormente mencionado, del cual se obtienen 4 muestras purificadas, pero estas son descartadas para ser analizadas por HPLC preparativa.

2.4.2.2 Tratamiento de la extracción

Antes de poder ser utilizada la muestra esta debió ser nuevamente limpiada, por lo cual se elige el balón número 1, el cual fue obtenido en las pruebas de rendimiento de extracción con CH_3CN , para el procedimiento.

- En primer lugar, se pasa la muestra del balón a un embudo de decantación, para eso se le agregan 50 mL de Hexano y una vez ya traspasado al embudo se le agregan 50mL de agua destilada, se agita y se deja reposar para la separación de la fase orgánica con la fase acuosa.
- Una vez están las fases separadas se traspasa la fase acuosa a un balón y se lleva a rotavapor para concentrar y ser guardada en un vial, mientras que a la fase orgánica se le agrega desecante para eliminar el agua y es filtrada por un embudo con algodón.
- La fase orgánica es recogida en un matraz, y se le adicionan 50 mL de agua destilada y 100 mL de hexano obteniéndose nuevamente dos fases, de la cual se recoge la de hexano para ser llevada a rotavapor y ser guardada en un vial.
- La fase acuosa es llevada a un embudo de decantación en donde se le añaden 100 mL de CH_2Cl_2 y 70 mL de agua destilada.
- Se recoge la fracción con diclorometano en un balón y se lleva a rotavapor hasta eliminar el solvente, y posteriormente ser traspasado a un vial.
- La fase acuosa es recogida en un balón y llevada al rotavapor para evaporar un poco el agua, la solución resultante fue pasada a un embudo de decantación, en donde se le adicionan 150 mL de acetato de etilo.
- Se recoge cada fase por separado en un balón y se llevan a rotavapor para eliminar solventes y ser traspasados a un vial.

- Las fracciones obtenidas son observadas por cromatografía de capa fina (CCF).
- Finalmente, las muestras obtenidas en este tratamiento son descartadas para ser pasadas por el equipo de cromatografía de partición centrifuga (CPC).

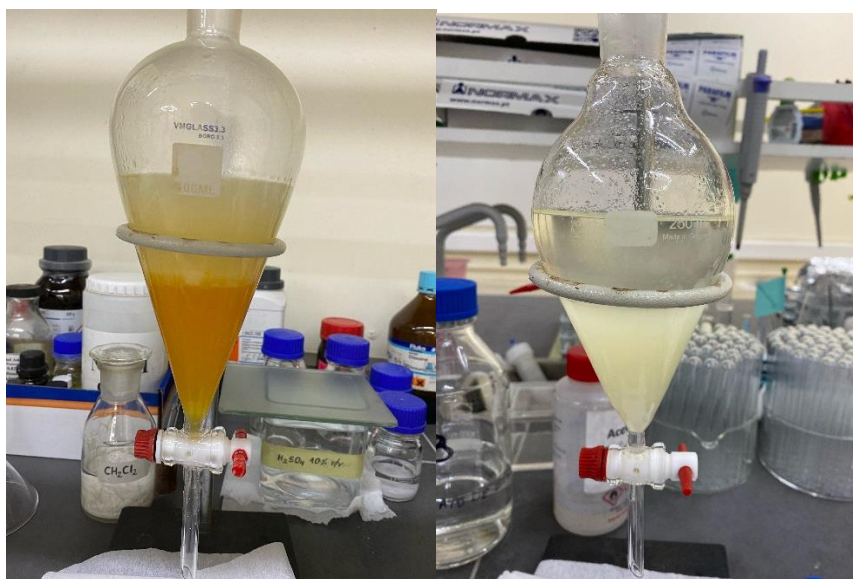


Figura 2-1: Extracciones de la muestra con sus dos fases orgánica y acuosa.

Fuente: Elaboración propia.

2.4.2.4 Inyección de la muestra en equipo CPC

Se escoge el balón numero 2 obtenido en las pruebas de rendimiento de extracción con Acetonitrilo para ser inyectado en el equipo, este balón cuenta con una masa de 1,4187 g. Para preparar la muestra esta es previamente disuelta con el sistema Arizona Q, es decir, es disuelta con 3 mL de Heptano; 2 mL de AcOEt; 3mL de Metanol y 2mL de agua destilada. La solución resultante es recogida con una jeringa y agitada para ser inyectada en el equipo.

Luego de finalizado el análisis, se procede al lavado, del cual se recoge una muestra en un balón.

Las fracciones obtenidas durante el análisis y lo recogido del lavado del equipo son observados por CCF, para lo cual se utilizó una fase de 90% Acetonitrilo-10% Agua destilada.

Las placas son revisadas y se decide juntar las siguientes fracciones 26-27; 28-29; 30-32; 34-37; 39-42; 43; 44-45; 46-50; 51-55; 56-71 para ser llevadas en balones a concentrar al rotavapor, una vez evaporados los solventes las muestras son pasadas a viales utilizando un poco de acetato de etilo. Finalmente, las nuevas fracciones son observadas por CCF en C18 utilizando la misma proporción de solventes 90-10 y por silica usando 70% Hexano- 30% Acetato de Etilo.

2.4.2.5 Inyección de la fracción obtenida en CPC en equipo de HPLC

Se utiliza el vial con las fracciones 56-71 obtenidas en el procedimiento anteriormente descrito para ser inyectado en el equipo de HPLC preparativa, utilizando una columna C18. Terminado el análisis las fracciones obtenidas son observadas por CCF en C18.

Las fracciones 5;6;12 y 13 que corresponden a los picos más altos en el cromatograma son enviados a RMN con Methanol-D4. Las demás fracciones son juntadas de acuerdo con las placas obtenidas por CCF.

2.4.2.6 Análisis de la oleo resina extraída con CH₃CN, en equipo de HPLC preparativa

Para el análisis de la muestra en el equipo se utilizó una columna de cromatografía flash, la cual se preparó mezclando 1,3145 g de silica (para el relleno) y 0,9178 g de la oleo resina del balón número 3 obtenido en las pruebas de rendimiento de extracción con Acetonitrilo.

Para la fase móvil se utilizó una mezcla de Hexano/Acetato de Etilo de gradientes ascendentes comenzando con una proporción de 95% Hexano-5% Acetato de etilo, para luego cambiar la fase a 100% Acetato de Etilo y finalizar el análisis con 100% de Metanol como fase móvil y así limpiar la columna. Terminado el análisis las fracciones obtenidas son observadas por CCF con silica y las fracciones 28; 34; 45; 48; 58; 62; 63; 64; 66; 67 y 71 son enviadas a RMN.

Finalmente, las fracciones 62-63-64 son inyectadas en los equipos de HPLC analítico y GC/MS.

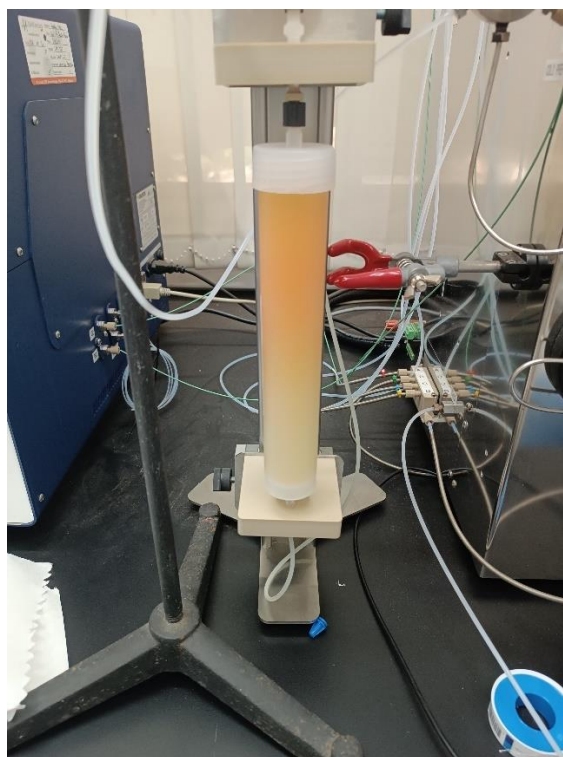


Figura 2-2: Separación muestra de oleo resina en un cartucho Flash.

Fuente: Elaboración propia.

2.5 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

2.5.1. Fórmula utilizada para el porcentaje de rendimiento.

$$\%Re: \frac{\text{Masa experimental}}{\text{Masa teórica}} \times 100$$

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

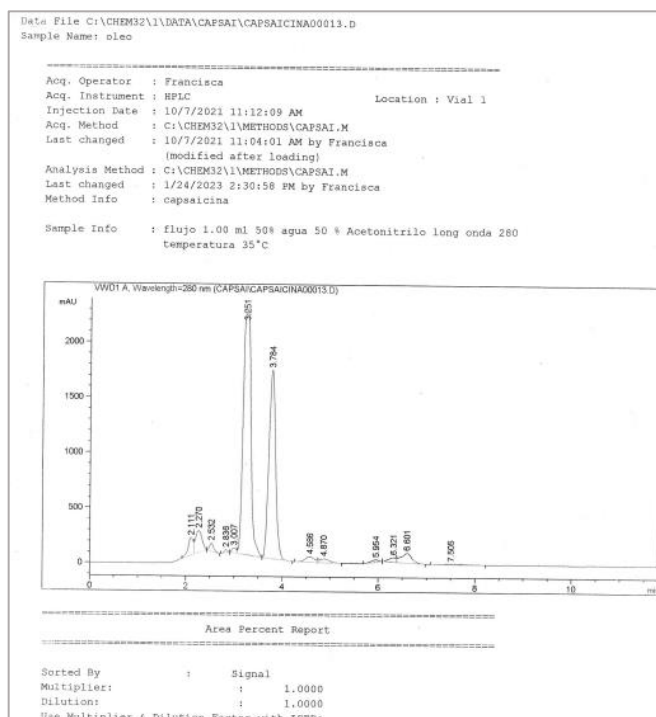
3 RESULTADOS

3.1 RESULTADOS HPLC ANALÍTICO

3.1.1 Muestra de oleo resina extraída con Acetonitrilo

La muestra de oleo resina con la que se lograron obtener mejores resultados al momento de realizar la separación en el equipo de HPLC Analítico fue la descrita en el apartado C de los tratamientos mencionados en el punto 2.4.1.1, utilizando una temperatura de 35°C para el análisis.

En la Figura 3-1 se puede observar el cromatograma correspondiente a esta muestra, en donde se pueden apreciar dos señales importantes, la primera señal que es la más grande aparece a los 3,251 min y corresponde a la Capsaicina, esto debido a que es el capsaicinoide más abundante en la oleo resina, y la segunda señal que aparece seguido de ésta a los 3,784 min y corresponde a la Dihidrocapsaicina.



Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	2.111	BV	0.1046	1114.20020	159.94588	2.2970	
2	2.270	VB	0.1442	1923.67554	200.13564	3.9659	
3	2.532	BB	0.0935	439.24567	72.98026	0.9056	
4	2.836	BB	0.0844	136.05739	25.96409	0.2805	
5	3.007	BV	0.0956	254.89960	42.87166	0.5255	
6	3.251	VB	0.1806	2.47591e4	2203.30078	51.0435	
7	3.784	BB	0.1509	1.65488e4	1708.53845	34.1170	
8	4.586	BV	0.2038	643.48792	48.66033	1.3266	
9	4.870	VB	0.2185	471.73090	34.33441	0.9725	
10	5.954	BB	0.1816	233.72328	20.20069	0.4818	
11	6.321	BV	0.1585	441.84250	40.77488	0.9109	
12	6.601	VB	0.2216	1385.03528	87.93562	2.8554	
13	7.505	BB	0.4381	154.15494	4.49330	0.3178	
Totals :				4.85059e4	4650.13598		

Figura 3-1: Cromatograma muestra de oleo resina limpiada con Acetonitrilo.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2 Resultados Fracción 62

La fracción 62 fue obtenida al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash, logrando con esto mejores resultados al momento de pasar la muestra por el equipo de HPLC analítico, manteniéndose las mismas condiciones utilizadas con las muestras anteriores.

En la Figura 3-2 se puede observar el cromatograma correspondiente a esta muestra, en donde se puede ver que en comparación con el cromatograma anterior (Figura 3-1) se logra una importante disminución de los capsaicinoides e impurezas que aparecen al comienzo de la separación, obteniéndose con ello una muestra más limpia.

La primera señal importante que aparece en el cromatograma a los 3,266 min corresponde a la Capsaicina, y la segunda señal que aparece a los 3,842 min corresponde a la Dihidrocapsaicina.

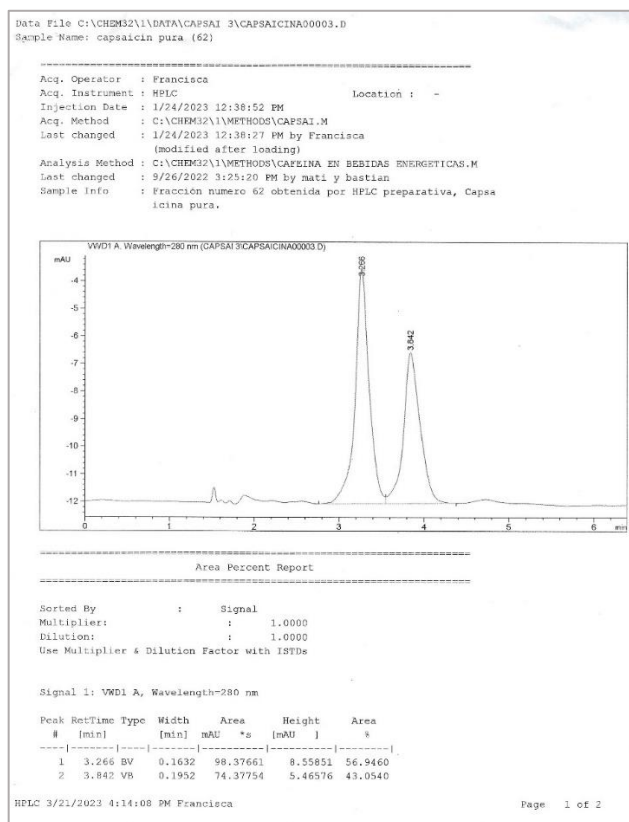


Figura 3-2: Cromatograma de Fracción 62 obtenida por HPLC Flash.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3 Resultados Fracción 63

La fracción 63 al igual que la fracción 62 fue obtenida al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash.

En la Figura 3-3 se puede observar el cromatograma correspondiente a esta muestra, en donde se puede apreciar que las impurezas y capsaicinoides que habían sido eliminados en la muestra anterior volvieron a aparecer, pero en concentraciones mínimas, por otro lado, se observan dos señales, la más grande que aparece en el minuto 3,211 corresponde

a la capsaicina y la que aparece seguido a ésta a los 3,669 minutos corresponde la dihidrocapsaicina, la cual se encuentra en menor concentración en relación a los casos anteriores.

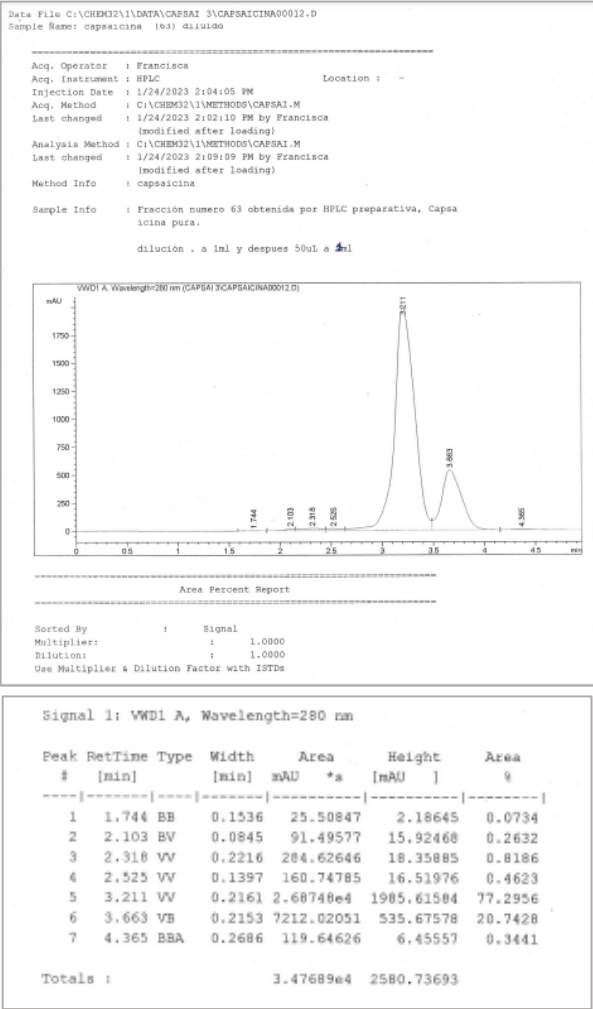


Figura 3-3: Cromatograma de Fracción 63 obtenida por HPLC Flash.

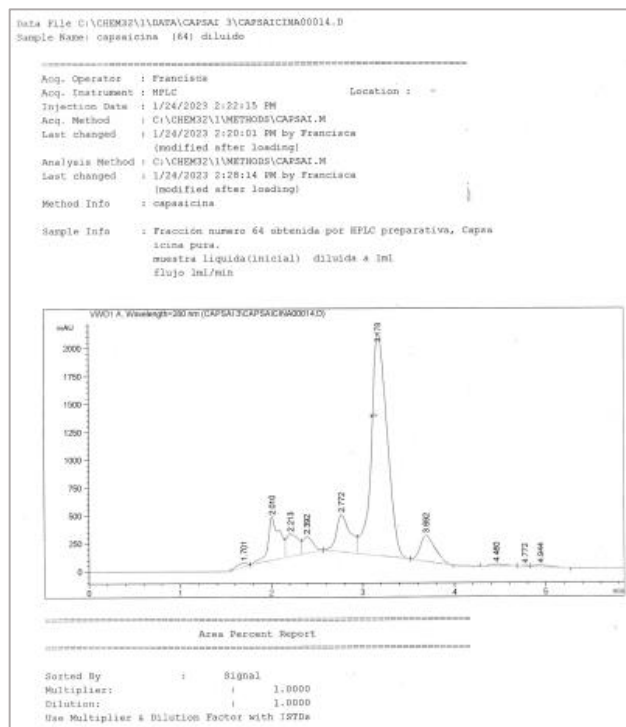
Fuente: Elaboración propia.

3.1.4 Resultados Fracción 64

La fracción 64, al igual que la fracción 62 y 63, fue obtenida al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash, para posteriormente ser inyectada en el equipo de HPLC analítico, manteniendo las mismas condiciones utilizadas en los casos anteriores.

En la Figura 3-4 se puede observar el cromatograma correspondiente a esta muestra, en donde se puede apreciar que los capsaicinoides e impurezas han vuelto a aparecer y en mayor concentración que en la muestra anterior (muestra 63).

Por otro lado, se logra ver solamente una señal significativa en el cromatograma que aparece en el minuto 3,178 y corresponde a la Capsaicina, la cual se encuentra en este caso más concentrada que en las muestras anteriores. También se observa que se logró una importante disminución en la concentración de la Dihidrocapsaicina, que aparece en el minuto 3,692.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.701	BB	0.1536	271.56543	28.82116	0.7339
2	2.010	BV	0.1237	3383.02832	382.14456	9.1430
3	2.213	VV	0.1362	1779.79211	199.30956	4.8101
4	2.392	VB	0.1195	1137.06226	146.82671	3.0730
5	2.772	BV	0.1508	3463.56177	332.05127	9.3606
6	3.178	VB	0.1847	2.39592e4	1982.81665	64.7521
7	3.692	BB	0.1686	2586.17065	230.84790	6.9894
8	4.460	BB	0.1855	194.09010	17.01649	0.5245
9	4.772	BV	0.1046	34.74935	4.98585	0.0939
10	4.944	VB	0.1988	192.21021	14.18707	0.5195
Totals :				3.70015e4	3339.00721	

Figura 3-4: Cromatograma de Fracción 64 obtenida por HPLC Flash.

Fuente: Elaboración propia

3.2 RESULTADOS HPLC PREPARATIVA

3.2.1 Resumen Pruebas de Rendimiento de Extracción

Tabla 3-1: Resumen rendimiento de extracción con CH₃CN.

EXTRACCIÓN CON ACETONITRILO				
Número de la extracción	Masa de extracto utilizada	Volumen de Solvente	Masa de extracto obtenida	Rendimiento %
Extracción N° 1	20,04 g	20 mL	1,4511 g	7,24 %
Extracción N° 2	20,01 g	20 mL	1,4187 g	7,09 %
Extracción N° 3	20,06 g	20 mL	1,5338 g	7,65%
Extracción N° 4	20,04g	20 mL	1,4823 g	7,40 %

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3-2: Resumen rendimiento de extracción con CH₃OH.

EXTRACCIÓN CON METANOL				
Número de la extracción	Masa de extracto utilizada	Volumen de Solvente	Masa de extracto obtenida	Rendimiento %
Extracción N° 1	20,01 g	20 mL	5,4694 g	27,33 %
Extracción N° 2	20,00 g	20 mL	5,5605 g	27,80 %
Extracción N° 3	20,08 g	20 mL	5,9919 g	29,84 %

Extracción N° 4	20,01 g	20 mL	5,9929 g	29,95 %
-----------------	---------	-------	----------	---------

Fuente: Elaboración propia

3.2.2 Resumen fracciones obtenidas por CPC

Tabla 3-3: Resumen fracciones obtenidas por CPC.

Masa de extracto utilizada para el análisis	Numero de las fracciones	Masa de extracto obtenida	Masa total de extracto
1,4187 g	Fracción 26-27	0,4233 g	
	Fracción 28-29	0,0254 g	
	Fracción 30-32	0,0055 g	
	Fracción 34-37	0,0006 g	
	Fracción 39-42	0,0005 g	
	Fracción 43	0,0002 g	
	Fracción 44-45	0,0003 g	
	Fracción 46-50	0,0085 g	

	Fracción 51-55	0,0079 g	
	Fracción 56-71	0,3334 g	
			0,8056 g

Fuente: Elaboración propia

3.2.3 Resumen fracciones obtenidas de la muestra 56-71

Tabla 3-4: Resumen fracciones obtenidas de la muestra 56-71.

Masa de extracto utilizada para el análisis	Numero de las fracciones	Masa de extracto obtenida	Masa total de extracto
0,3334 g	Fracción 2-4	0,0122 g	
	Fracción 5	0,0017 g	
	Fracción 6	0,0015 g	
	Fracción 7-9	0,0033 g	
	Fracción 10 y 14	0,0042 g	
	Fracción 12	0,0011 g	

	Fracción 13	0,0012 g	
	Fracción 16-20	0,0039 g	
	Fracción 21-26	0,0018 g	
			0,0309 g

Fuente: Elaboración propia.

3.2.4 Resumen fracciones obtenidas por Flash

Tabla 3-5: Resumen fracciones obtenidas por cromatografía Flash.

Masa de extracto utilizada para el análisis	Numero de las fracciones	Masa de extracto obtenida	Masa total de extracto
	Fracción 9-18	0,0147 g	
	Fracción 19-23	0,0116 g	
	Fracción 24-44	0,0646 g	
	Fracción 46-60	0,2013 g	
	Fracción 61	0,0048 g	

0,9178 g	Fracción 62	0,0023 g	
	Fracción 63	0,0039 g	
	Fracción 64	0,0054 g	
	Fracción 65	0,0071 g	
	Fracción 66	0,0124 g	
	Fracción 67	0,0068 g	
	Fracción 68	0,0043 g	
	Fracción 69-77	0,0197 g	
	Fracción 78-81	0,0095 g	
	Fracción 82-106	0,0547 g	
			0,4231 g

Fuente: Elaboración propia.

3.3 RESULTADOS RMN

3.3.1 ^1H -RMN Fracción 62

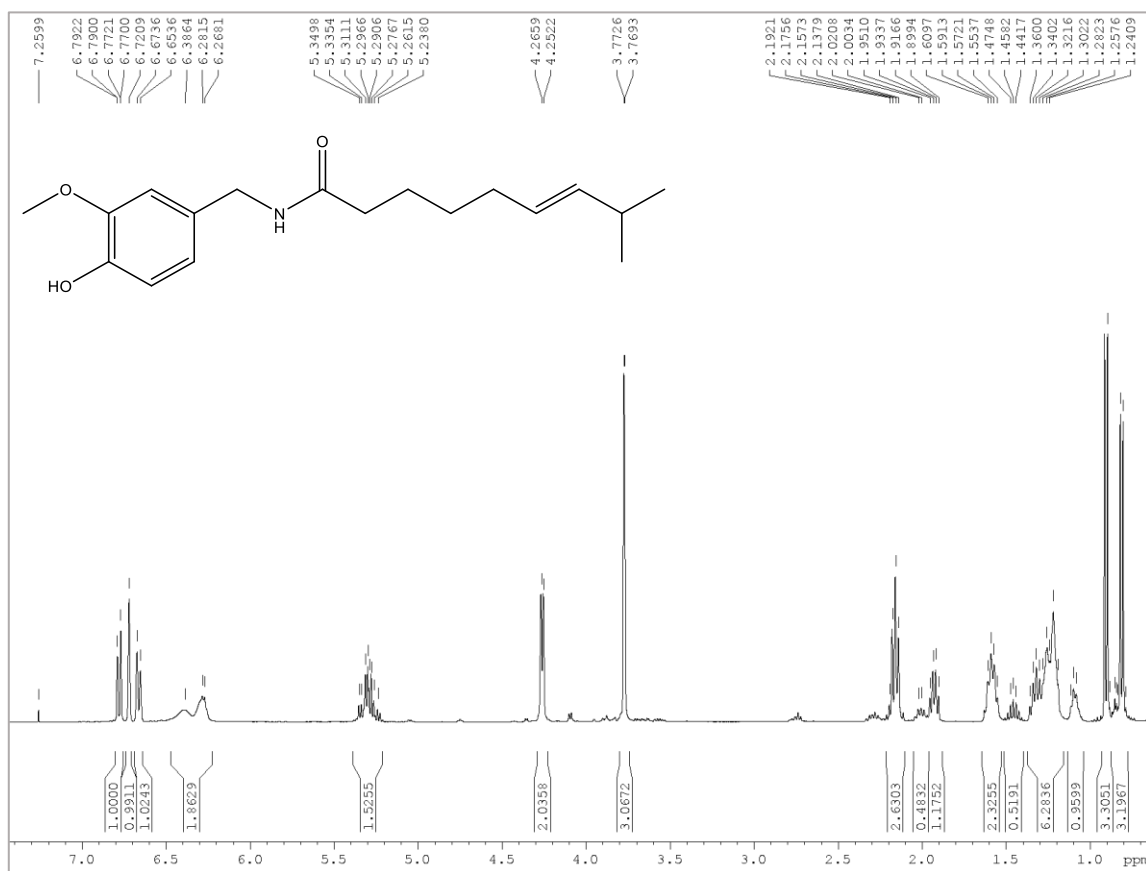


Figura 3-5: ^1H -RMN Fracción 62

Fuente: Elaboración propia

3.3.2 ^{13}C -RMN Fracción 62

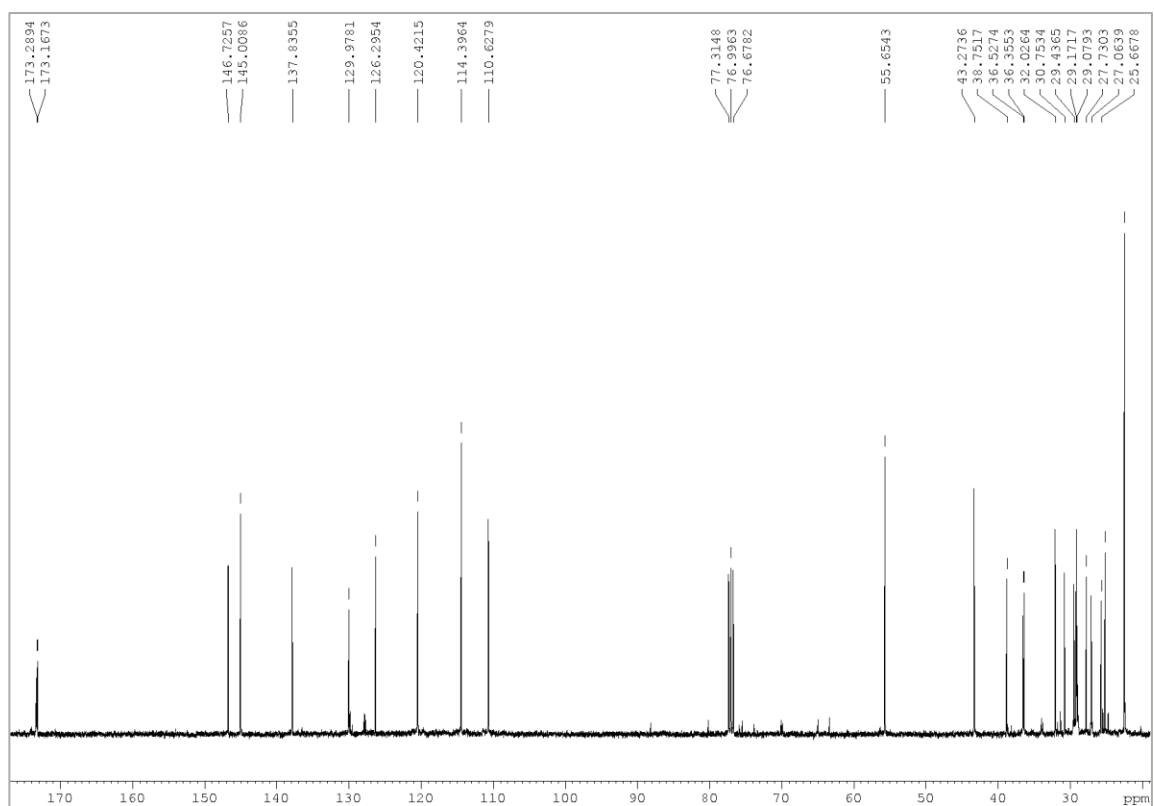


Figura 3-6: ^{13}C -RMN Fracción 62

Fuente: Elaboración propia

3.4 RESULTADOS CG-MS

3.4.1 Fracción 62

En la figura 3-7 se puede observar el cromatograma de masas de la fracción 62 la cual fue obtenida al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash, en este se puede apreciar la señal correspondiente a la capsaicina a los 20,907 min y la de la dihidrocapsaicina a los 21,010 min.

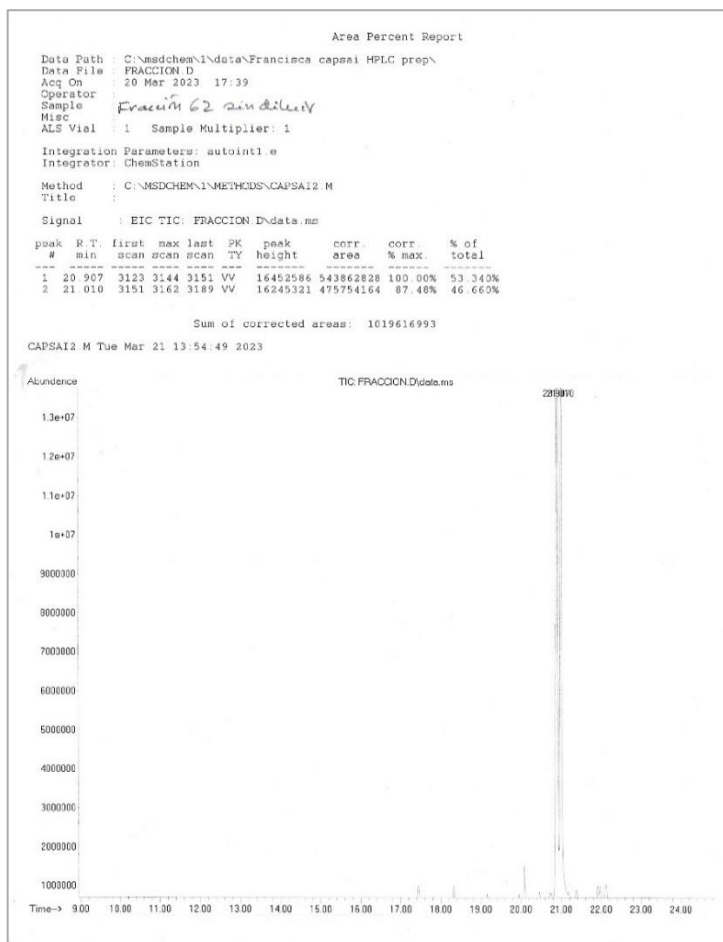


Figura 3-7: Cromatograma de masas de Fracción 62 obtenida por HPLC Flash.

Fuente: Elaboración propia.

3.4.2 Fracción 63

En la figura 3-8 observa el cromatograma de masas de la fracción 63 la cual fue obtenida al igual que la fracción 62 al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash. En este cromatograma se puede apreciar la señal correspondiente a la capsaicina a los 20,896 min y la de la dihidrocapsaicina a los 20,978 min.

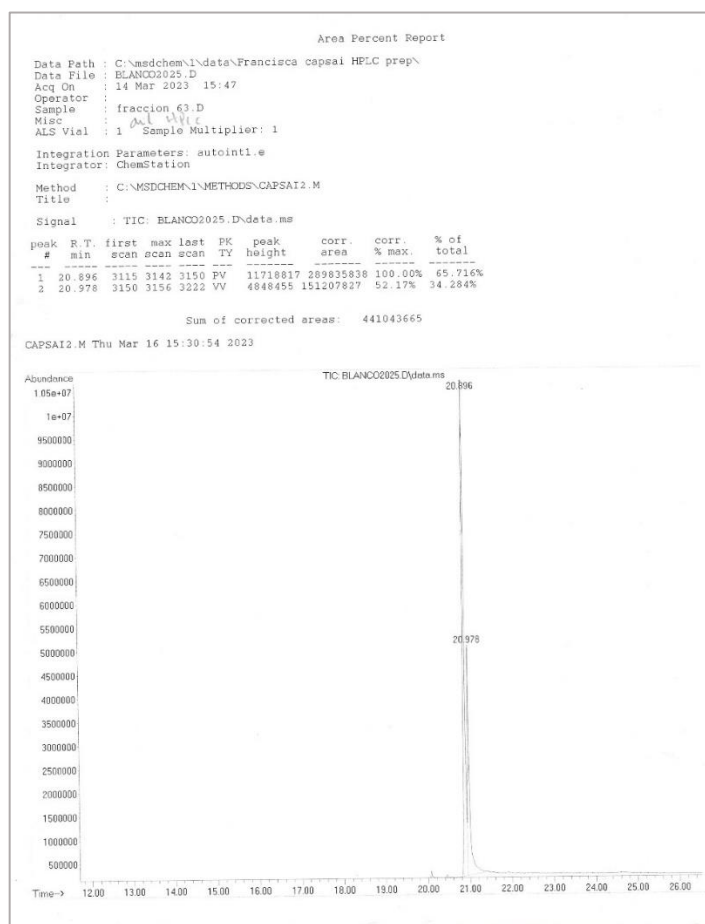


Figura 3-8: Cromatograma de masas de Fracción 63 obtenida por HPLC Flash.

Fuente: Elaboración propia

3.4.3 Fracción 64

En la figura 3-9 observa el cromatograma de masas de la fracción 64 la cual fue obtenida al igual que la fracción 62 y 63 al pasar la muestra de oleo resina previamente tratada por una columna Flash. En este cromatograma se puede apreciar la señal correspondiente a la capsaicina a los 20,882 min y la de la dihidrocapsaicina a los 20,966 min.

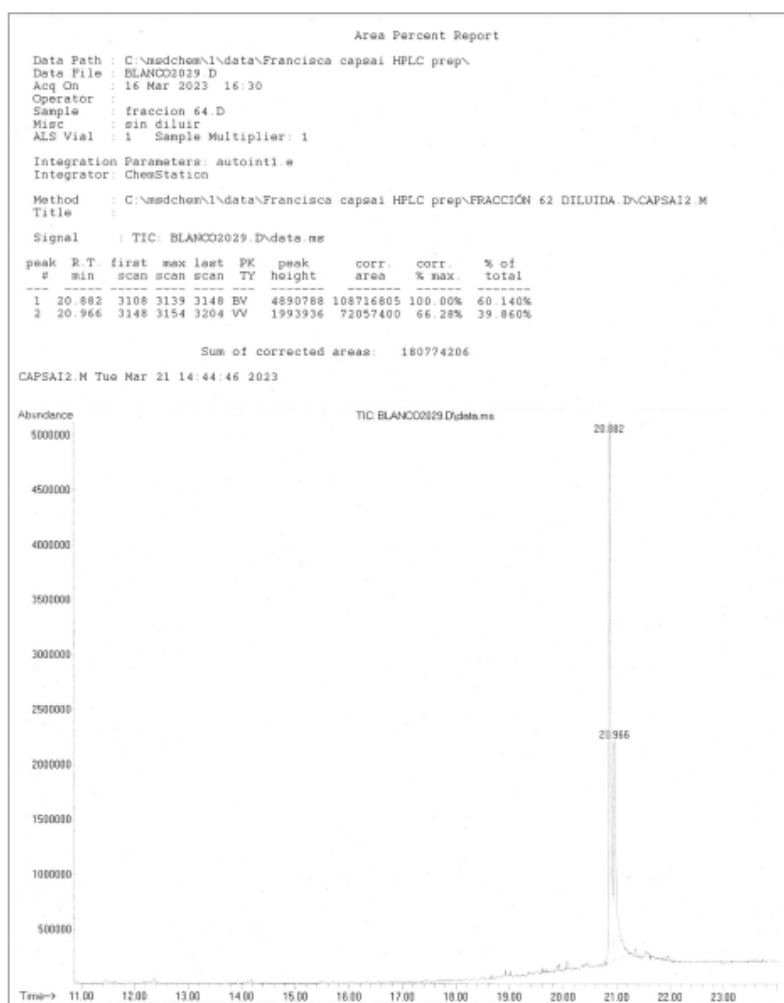


Figura 3-9: Cromatograma de masas de Fracción 64 obtenida por HPLC Flash.

Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para las pruebas de rendimiento de extracción de la muestra se logra apreciar que los valores o resultados varían dependiendo del solvente utilizado, en el caso del Metanol se obtuvo un rendimiento promedio de 28,73% y con acetonitrilo se obtuvo un rendimiento promedio de 7,35%, esto debido a que el metanol arrastra de la muestra una mayor cantidad de impurezas y capsaicinoides.

Respecto a los resultados obtenidos al analizar el balón numero 2 obtenido en las pruebas de rendimiento de extracción con acetonitrilo por el equipo de CPC, y el posterior análisis de la fracción numero 56-71 por el equipo de HPLC Preparativa, se puede concluir que no fue un método favorable para lograr la separación de los capsaicinoides, esto debido a que la muestra quedo demasiado diluida y al momento de analizarla por HPLC analítica no se pudo identificar ni cuantificar ninguno de los capsaicinoides de interés.

Por otro lado, se puede observar según los resultados obtenidos mediante el análisis de la muestra a través de HPLC Preparativo y Analítico, que no se pudo cumplir con el objetivo principal del trabajo, el cual constaba en lograr la completa separación de los dos capsaicinoides presentes en la oleo resina de capsicum, en cambio, se logró a través del uso de una columna de cromatografía Flash en el equipo de HPLC Preparativa, disminuir la concentración de impurezas, aumentar la concentración de la capsaicina y disminuir la concentración de la dihidrocapsaicina, logrando una relación de 77%-20% entre los capsaicinoides en el caso de la fracción número 63 y de 64%-6% para la fracción número 64, valores que se pueden comparar con la concentración de la muestra pura solamente tratada con acetonitrilo e inyectada directamente en el equipo de HPLC analítico, la cual dio una relación de 51%-34% entre los capsaicinoides.

La separación de los capsaicinoides no pudo ser realizada en una columna C18 como se tenía propuesto, esto debido a que la muestra tiene una polaridad muy alta y podía quedar retenida en la columna y dañarla. Para poder utilizar esta columna en el análisis se debería realizar una derivatización de la muestra de oleo resina, lo cual

significaría transformar el compuesto químico en un producto que posee una estructura química similar pero que posee una reactividad química, solubilidad, punto de ebullición, punto de fusión, estado de agregación o polaridad diferentes a las originales. Estas nuevas propiedades químicas pueden ser utilizadas para la cuantificación o separación del compuesto.

Esta derivatización se llevaría a cabo a través de la reacción de adición de alquenos, en donde se añadiría Acido Bromhídrico al compuesto para que éste actuara en el doble enlace de la cadena.

Finalmente, los espectros obtenidos al analizar la fracción 62 por RMN, dieron como resultado que en la muestra se encontraba solamente la Capsaicina, pero al momento de analizar la fracción por HPLC Analítico y CG-MS en el cromatograma volvió a aparecer la dihidrocapsaicina y varios capsaicinoides más, por lo cual la fracción no se encontraba pura como se había pensado o quizás el equipo se encontraba sucio al momento de utilizarlo.

CONCLUSIÓN

- No se logró cumplir con el objetivo principal del trabajo, lo cual implicaba establecer un método para la separación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina a través de Cromatografía líquida preparativa.
- Al no obtener buenos resultados con el método de purificación del extracto de oleo resina por el equipo de CPC y su posterior análisis en el equipo de HPLC preparativa, se recomienda para futuras pruebas variar las condiciones utilizadas y las proporciones de los solventes (Sistema Arizona), así como también los métodos de extracción de la oleo resina, con lo cual se podrían obtener mejores resultados.
- Se obtuvieron 3 fracciones significativas (62-63-64), al analizar el extracto de la muestra de oleo resina por cromatografía en columna Flash, en las cuales se pudo observar que se logró un aumento en la concentración de la Capsaicina y una disminución de la concentración de Dihidrocapsaicina y de las impurezas presentes en la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mauricio Restrepo Gallego. (julio-diciembre, 2006). *Oleorresinas de capsicum en la industria alimentaria*. Revista Lasallista de Investigación, vol. 3, núm. 2, pp. 43-47 Corporación Universitaria Lasallista Antioquia, Colombia
- [2] http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/martinez_g_aa/capitulo5.pdf
- [3] Guadalupe. López; Manuel. Ramírez; Ingrid. Rodríguez. *Capsaicinoides en chile habanero (capsicum chinense .J) y factores que afectan su producción*. Yucatán, México.
- [4] Chica. García. (20 de enero del 2018). *Capsaicinoides en pimientos (Capsicum anunum)*. Machala; El Oro. Ecuador.
- [5] Lorena. Jaen. Serrano. (2017-2018). *Análisis estadístico de datos de espectro de 48 muestras de pimientos picantes: Desarrollo de la media, varianza, desviación estándar y grafico estadístico*. Universidad técnica de Machala.
- [6] Skoog. D.; Holler. F. y Nieman. T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: McGrawHill.
- [7] Skoog. D.; West D.; Holler. F. y Crouch. S. (2005). *Fundamento de Química Analítica*. México: Thomson.
- [8] Daniela. Suarez. Ospina; Yovanny. Morales. Hernández. (7 de septiembre de 2018). *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas*. Revista Semilleros: Formación Investigativa, vol. 4 N° 1
- [9] McMurry. J. (2008). *Química Orgánica*. México: Cengage L.
- [10] Laurella. S. (2016). *Resonancia Magnetica Nuclear*. Argentina: Edulp.
- [11] Espinoza. L. (2004). *Introducción a la resonancia magnética nuclear de alta resolución 1D y 2D*. Valparaíso.

- [12] https://usmcl-my.sharepoint.com/personal/lautaro_taborga_usm_cl/_layouts/15/onedrive.aspx?ga=1&id=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC%2FAlkane%20effect%20in%20the%20Arizona%20Epdf&parent=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC
- [13] https://usmcl-my.sharepoint.com/personal/lautaro_taborga_usm_cl/_layouts/15/onedrive.aspx?ga=1&id=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC%2FCCC%20Solvent%20Selection%20Protocol%20Epdf&parent=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC
- [14] https://usmcl-my.sharepoint.com/personal/lautaro_taborga_usm_cl/_layouts/15/onedrive.aspx?ga=1&id=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC%2FCounterCurrent%20chromatography%20in%20analytical%20chemistry%20Epdf&parent=%2Fpersonal%2Flautaro%5Ftaborga%5Fusm%5Fcl%2FDocuments%2FB100%2FPLC%2DCPC%2FBiblioteca%20CPC
- [15] <https://cromlab-instruments.es/fcpc-2/#:~:text=El%20Cromat%C3%B3grafo%20de%20Partici%C3%B3n%20Centr%C3%ADfuga,y%20se%20separan%20m%C3%BAltiples%20veces.>
- [16] M.C. Gutiérrez; M. Droguety. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor.*
- [17] <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gasesliquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>

ANEXOS

Anexo A

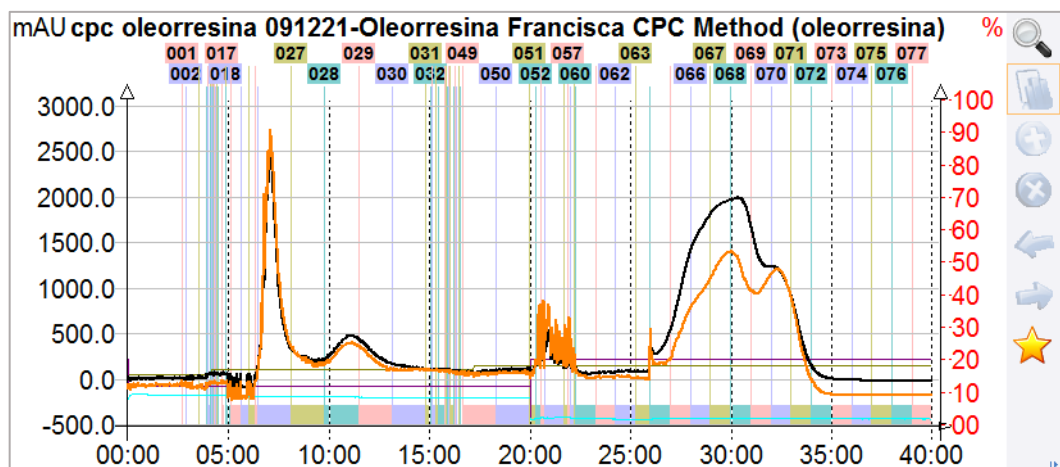
Table 2 The 23 Arizona system compositions

Letter	v/v/v/v				Initial % v/v				Upper/lower	
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	phase ratio	Settling time (s)
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.0	50.0	0.88	36
B	1	19	1	19	2.5	47.5	2.5	47.5	0.92	31
C	1	9	1	9	5.0	45.0	5.0	45.0	0.965	28
D	1	6	1	6	7.1	42.9	7.1	42.9	0.96	29
F	1	5	1	5	8.3	41.7	8.3	41.7	0.95	30
G	1	4	1	4	10.0	40.0	10.0	40.0	0.95	25
H	1	3	1	3	12.5	37.5	12.5	37.5	0.945	25
J	2	5	2	5	14.3	35.7	14.3	35.7	0.91	20
K	1	2	1	2	16.7	33.3	16.7	33.3	0.88	21
L	2	3	2	3	20.0	30.0	20.0	30.0	0.84	18
M	5	6	5	6	22.7	27.3	22.7	27.3	0.80	17
N	1	1	1	1	25.0	25.0	25.0	25.0	0.70	22
P	6	5	6	5	27.3	22.7	27.3	22.7	0.69	21
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	30.0	20.0	0.68	20
R	2	1	2	1	33.3	16.7	33.3	16.7	0.68	18
S	5	2	5	2	35.7	14.3	35.7	14.3	0.70	15
T	3	1	3	1	37.5	12.5	37.5	12.5	0.735	14
U	4	1	4	1	40.0	10.0	40.0	10.0	0.76	14
V	5	1	5	1	41.7	8.3	41.7	8.3	0.78	14
W	6	1	6	1	42.9	7.1	42.9	7.1	0.775	13
X	9	1	9	1	45.0	5.0	45.0	5.0	0.77	11
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	47.5	2.5	0.71	10
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.45	10

The upper to lower phase volume ratios and settling times are given for freshly prepared heptane-containing liquid systems (± 5 s)

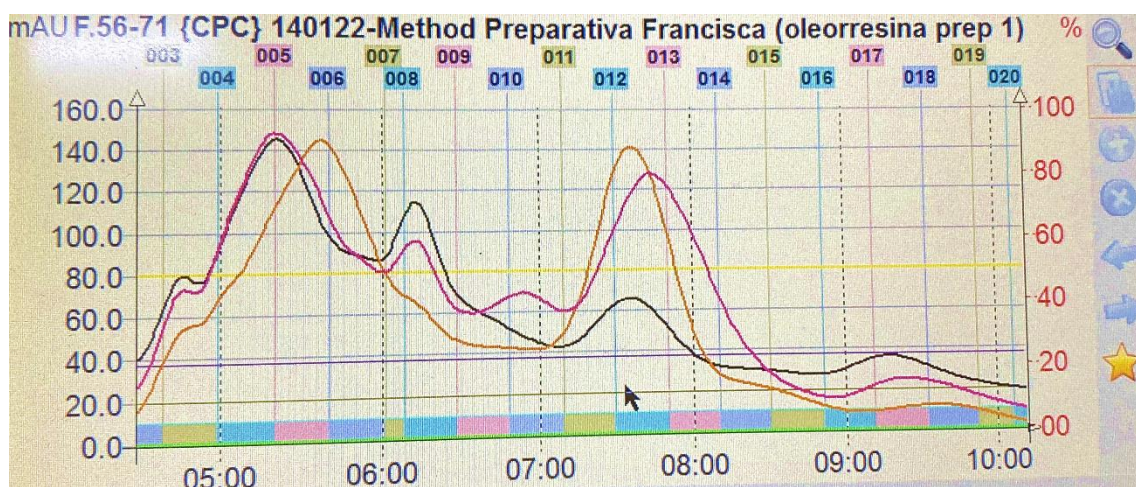
Sistema Arizona

Anexo B



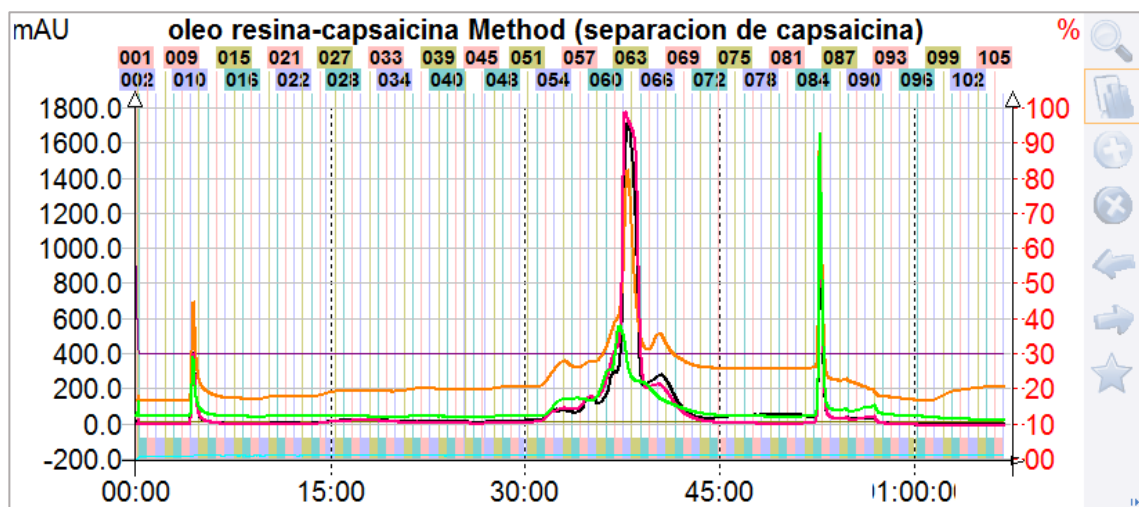
Cromatograma Muestra de oleo resina inyectada en equipo CPC

Anexo C

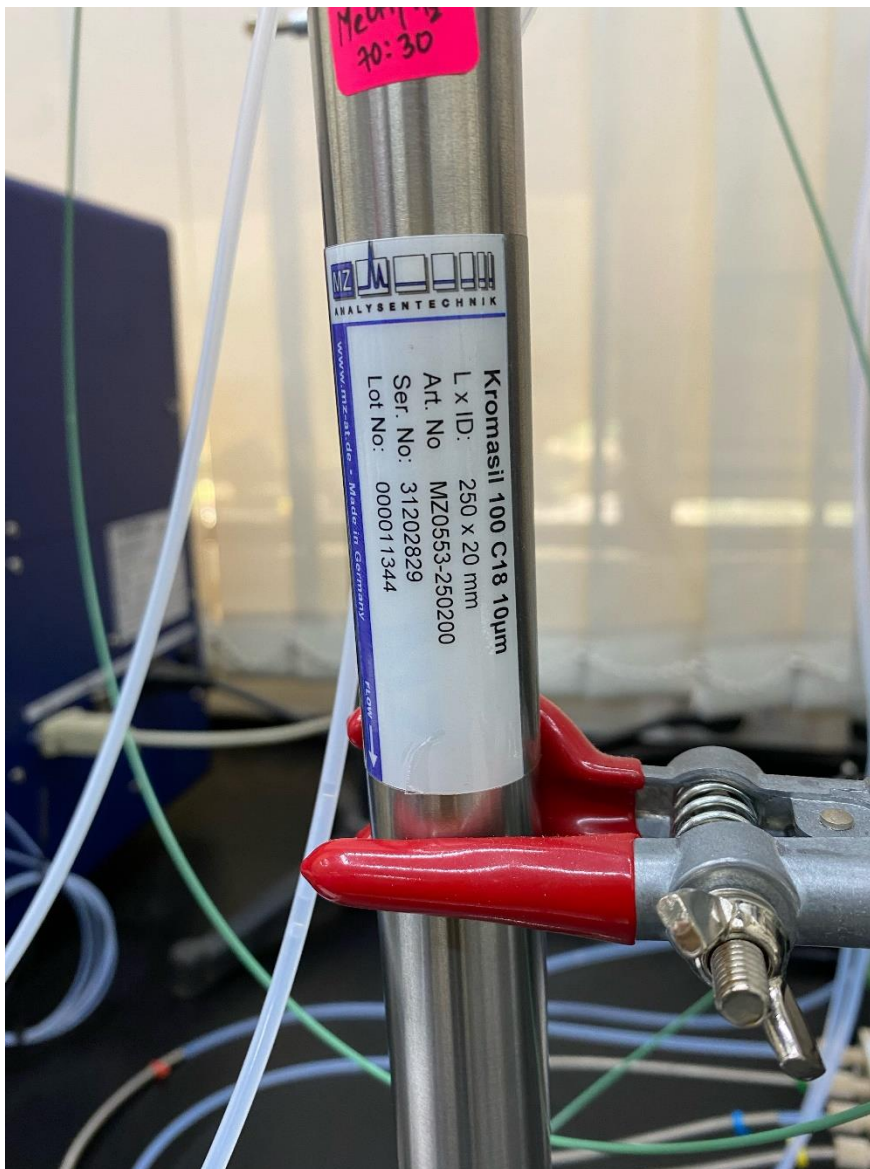


Cromatograma Fracción 56-71 inyectada en equipo HPLC preparativo

Anexo D



Anexo E



Columna C18 utilizada en análisis de fracción 56-71

