

ANÁLISIS PRELIMINAR DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPSAICINOIDES EN VARIEDADES DE CHILE CON DIFERENTE CAPACIDAD PUNGENTE

Salvador Horacio Guzmán Maldonado^{1*}, Irineo Torres Pacheco¹, Mario González Chavira¹, María Alejandra Mora Avilés¹, Ma. Guadalupe Herrera Hernández^{1,2} y David Hernández López²

*Autor responsable: guzman.horacio@inifap.gob.mx

RESUMEN

El chile jalapeño provoca un alto nivel de irritación a diferentes niveles del tracto estomacal en comparación con el chile habanero. A pesar de que el chile habanero presenta una mayor capacidad pungente, no es irritante. A la fecha se desconoce la naturaleza de los compuestos responsables de este efecto. En el presente trabajo se reporta el análisis preliminar de los componentes fenólicos y capsaicinoides identificados a través de un análisis cromatográfico (HPLC) en chile jalapeño y habanero con y sin semilla. Se detectaron 35 picos cromatográficos de compuestos fenólicos y 13 de compuestos capsaicinoides. Se observó que el ácido fenólico 4, hidroxí-3,metoxibenzoico sólo está presente en el chile jalapeño. Actualmente se está realizando la cuantificación de los compuestos identificados. Por otro lado, se identificó la capsaicina y la D-hidrocapsaicina en ambos tipos de chile. Además se detectaron compuestos capsaicinoides que están presentes solo en chile jalapeño y que presumiblemente pudieran estar relacionados con la capacidad irritante que presenta este tipo de chile. Será necesario identificar la naturaleza de los compuestos presentes únicamente en chile jalapeño, su concentración, naturaleza química y poder irritante para confirmar su relación con este efecto.

Palabras claves: fenólicos, capsaicinoides, chile jalapeño, habanero

INTRODUCCIÓN

El consumo de chile está ligado con la historia de América y en particular de México. Colón descubrió que en lugar de especies como la pimienta, este continente poseía muchas otras especies de plantas entre las que destacaba el chile al que bautizó con el nombre de pimienta. Los antiguos pobladores de América seleccionaron y mejoraron esta planta para dar origen a una gran variedad de tipos de chile. Los vestigios arqueológicos muestran que entre 5200 y 3400 AC los americanos nativos ya sembraban plantas cultivadas de chile. Una vez que esta especie llegó a España su uso encontró una rápida difusión a nivel mundial. En consecuencia, este condimento formó y forma parte de la dieta de los pobladores de muchos países de este y otros continentes (MacNeish 1964).

¹ INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Bajío, Unidad de Biotecnología.

² Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya.

El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica; se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, vitaminas como la C, E, y A y minerales. Además, el interés por esta planta se ha incrementado por la presencia de otros compuestos, conocidos como fitoquímicos, que tienen un efecto benéfico sobre la salud humana (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998). Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los ácidos fenólicos, de los cuales se sabe que reducen el riesgo de contraer cáncer, problemas cardiovasculares y otras enfermedades crónico degenerativas (Dillard y German, 2000).

Dado el gran auge en el consumo de chile, es importante que los beneficios que obtiene el hombre al consumirlo no se vea afectado por otros efectos provocados por algunos tipos de chile. En este sentido, además de las propiedades benéficas que contiene el chile, también contiene otros componentes de índole desconocida que se han relacionado con su consumo, en particular aquellos que provocan diferentes tipos de irritación. Se sabe que la irritación no está relacionada con la pungencia, ya que se conocen varios tipos de chile que son extremadamente pungentes y no causan irritación, mientras que otros no son tan pungentes pero son altamente irritantes.

Existen dos ejemplos de este tipo de chiles; por un lado, el chile jalapeño, el cual presenta un fruto de color verde a verde oscuro y en su estado completamente maduro presenta una coloración rojo intenso. Este tipo de chile se considera de picoso a muy picoso y se sabe que provoca irritación a diferentes niveles del tracto digestivo. Se cultiva ampliamente en diferentes regiones del país y es muy utilizado tanto en fresco como seco ahumado (chipotle).

Por otro lado, el chile habanero presenta diferentes colores: anaranjado, amarillo, blanco y rojo, predominando el color anaranjado que es preferido por el consumidor. Este tipo de chile es considerado extremadamente picante teniendo como característica que el nivel de pungencia no persistente y desaparece poco tiempo después que el fruto ha sido consumido (Laborde y Pozo, 1982). Una de las principales características, en contraste con el chile jalapeño, es que no provoca ningún tipo de irritación en el tracto estomacal. A la fecha no se ha realizado ningún intento por identificar la sustancia o sustancias responsables de la irritación; sin embargo, es importante identificar este compuesto(s) para fines de mejoramiento o manipulación genética.

El presente trabajo se realizó con el fin de explorar la posibilidad de identificar en forma diferencial la presencia de uno o varios compuestos que pudieran estar relacionados con la irritabilidad comparando patrones de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de diferentes extractos de chile habanero y jalapeño con y sin semilla de frutos completamente maduros. En esta primera etapa del proyecto, se reporta el análisis de los extractos de ácidos fenólicos y capsaicinoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Frutos de chile jalapeño y habanero en maduración completa fueron proporcionados Dr. Pozo-Campodónico del Campo Experimental Sur de Tamaulipas (INIFAP). Los frutos, con y sin semilla por separado, fueron almacenados bajo congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizados y almacenados a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Extracción de compuestos fenólicos. Se pesaron 1000 mg de muestra liofilizada y molida y se les adicionaron 10 ml de una solución de metanol al 30%. La muestra se agitó por cinco minutos y se filtro a través de papel Whatman No. 541. Se tomó una alícuota del extracto y se pasó a través de una membrana de $0.2\text{ }\mu\text{m}$; el filtrado fue colocado en un vial y refrigerado a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis por HPLC. Los diferentes compuestos serán identificados por comparación con ácidos fenólicos comerciales.

Extracción de capsaicinoides. Se pesaron 1000 mg de muestra liofilizada y molida y se le adicionaron 10 ml de acetonitrilo. Posteriormente, la muestra fue calentada a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. La muestra fue centrifugada a 100 x g por 10 min. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de $0.2\text{ }\mu\text{m}$, colocado en viales y almacenado a 5°C hasta su análisis. La capsaicina y la D-hidrocapsaicina fueron identificadas por comparación con estándares comerciales.

Análisis de HPLC. La separación en fase reversa de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en una columna Zorbax octadecilsilano (ODS) - C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$ tamaño de partícula, $15\text{ cm x }4.6\text{ mm i.d.}$). Se usó una precolumna Zorbax ODS - C18. Las condiciones de la fase móvil fueron idénticas a las empleadas por Ramamurthy y col. (1992).

La fase móvil gradiente corrió a 1.5 ml/min y consistió en solvente A: ácido acético /agua ($2:98\text{ v/v}$) y solvente B: ácido acético/ acetonitrilo / agua ($2:30:68\text{ v/v}$). Durante el análisis el gradiente del solvente fue programado de 10 a 100% de B en A en 30 minutos.

El detector UV se programó a 280 nm y el volumen de inyección fueron $20\text{ }\mu\text{l}$. Por otro lado, la separación en fase reversa de los compuestos capsaicinoides se llevó a cabo en una columna Zorbax octadecilsilano (ODS) - C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$ tamaño de partícula, $15\text{ cm x }4.6\text{ mm i.d.}$). Se usó una precolumna Zorbax ODS - C18. Las condiciones de la fase móvil fueron idénticas a las empleadas por Estrada y col. (2002).

La fase móvil isocrática corrió a 1 ml/min y consistió en 50% solvente A: 100% Acetonitrilo y 50% del solvente B:10% Acetonitrilo. El detector UV se programó a 280 nm y el volumen de inyección fueron $10\text{ }\mu\text{l}$. Todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Se utilizo un HPLC marca Agilent (serie 1100)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del análisis cromatográfico, se obtuvieron los perfiles de los compuestos fenólicos y capsaicinoides. La Figura 1 muestra un ejemplo de los patrones diferenciales obtenidos de los compuestos capsaicinoides de muestras de chile jalapeño con semilla y habanero con semilla.

Como puede observarse, se identificaron la capsaicina y la D-hidrocapsaicina que son los únicos estándares comerciales disponibles; los picos se observaron a tiempos de retención de 4.837 y 6.622 min. respectivamente, en ambas muestras.

Por otro lado, en el chile jalapeño se observaron tres picos con tiempo de retención de 1.884, 3.418, 10.059, respectivamente, que no están presentes en chile habanero (Figura 1). No obstante que estos picos no pueden ser identificados, no puede descartarse que pudieran estar involucrados en el efecto irritante que presenta este tipo de chile. Será necesario realizar otro tipo de análisis para identificar el tipo de compuesto de estos picos.

Por otro lado, se puede observar en la Figura 1 que el nivel de unidades respuesta del integrador (mAU) es mucho mayor en los picos de los compuestos capsaicinoides de chile habanero en comparación con el jalapeño. Las unidades de respuesta del integrador son una función directa de la concentración del compuesto identificado. El cálculo de concentraciones de cada pico se está llevando a cabo actualmente y se reportará en el futuro.

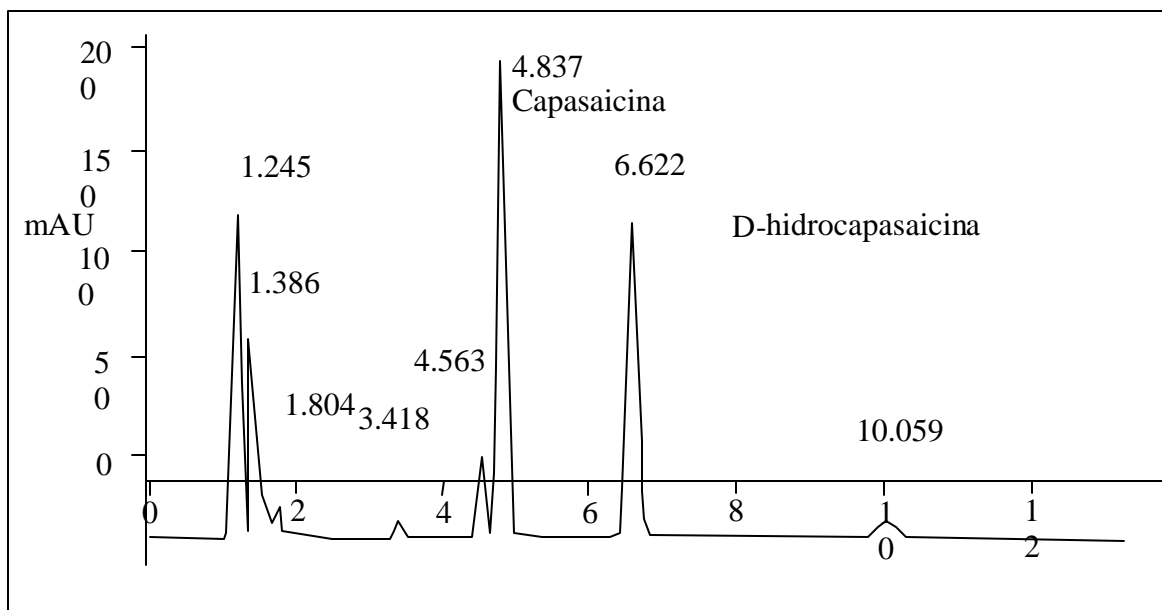
Sin embargo, se puede observar que la concentración de compuestos es visiblemente mayor en chile habanero que en el jalapeño. Este resultado concuerda con lo reportado por Kurian y Starks (2002) que indicaron que la concentración de capsaicina y D-hidrocapsaicina es mucho mayor en el chile habanero en comparación con la mayoría de uso común. No existen reportes en la literatura que hagan un análisis comparativo de compuestos fenólicos entre diferentes tipos de chile.

Los picos con sus respectivos tiempos de retención de los compuestos fenólicos y capsaicinoides de chile jalapeño y habanero con y sin semilla se reportan en el Cuadro 1 y 2, respectivamente. Como puede observarse en el Cuadro 1, se identificaron los ácidos fenólicos clorogénico (17), caféico (19) y el 4, hidroxí-3,metoxibenzoico (21). Interesantemente, los ácidos clorogénico y caféico sólo se encuentran en el fruto de ambos tipos de chile; sin embargo el 4, hidroxí-3,metoxibenzoico solo se identificó en el chile jalapeño.

Este es probablemente uno de los picos que pudieran estar relacionados con el efecto irritante de este tipo de chile. Además de estos compuestos, se identificaron otros picos que están presentes en forma diferencial en el chile Jalapeño; tal es el caso de los picos 11, 16, 18 y 32. Un análisis cuidadoso del Cuadro 1 mostrará que existen otros picos que están solo en fruto o en semilla.

A)

DAD1 A,Sig=280,4Ref=360.100 (CAPSA003.D)



B)

DAD1 A,Sig=280,4 Ref=360,100 (CAPSA004.D)

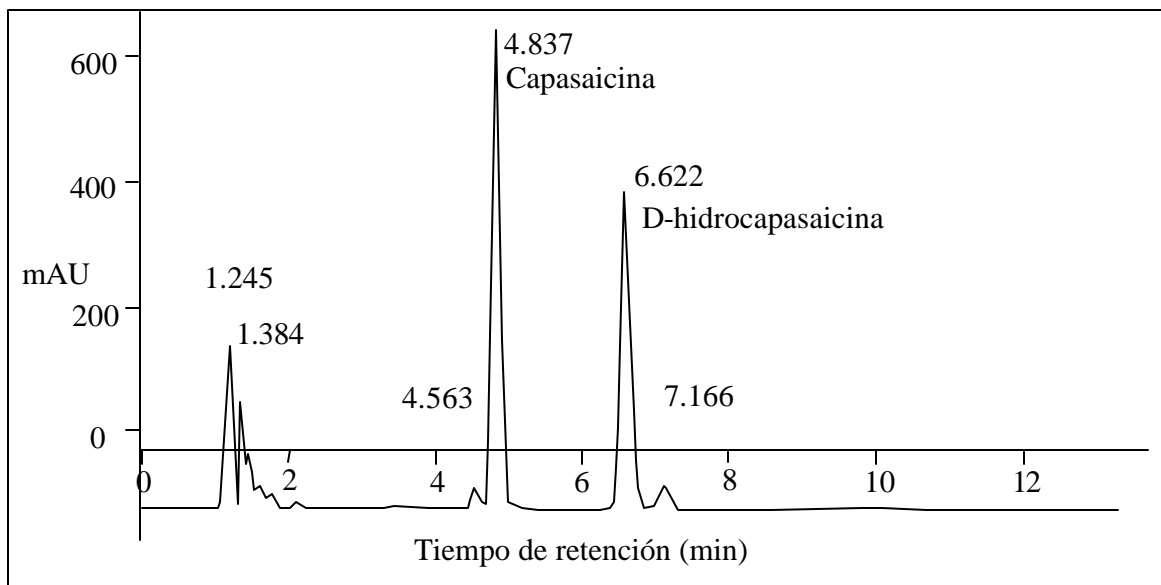


Figura 1. Cromatogramas (HPLC) de compuestos capsaicinoides obtenidos en dos muestras de chile con semilla: (A) jalapeño y (B) habanero.

**Cuadro 1. Cromatograma por HPLC de compuestos fenólicos presentes en Chile
Tiempo de retención (min)**

Jalapeño

Habanero

| No. Pico | Con semilla | Sin semilla | Con semilla | Sin semilla |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 1.147 | 1.147 | 1.147 | 1.147 |
| 2 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 3 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| 4 | 2.185 | 2.185 | 2.185 | 2.185 |
| 5 | 2.45 | 2.45 | 2.45 | 2.45 |
| 6 | 2.756 | 2.756 | 2.756 | 2.756 |
| 7 | 2.988 | 2.913 | | |
| 8 | | 3.135 | 3.117 | 3.221 |
| 9 | 3.973 | 3.965 | 3.575 | 3.965 |
| 10 | | 4.646 | 4.468 | 4.616 |
| 11 | 4.814 | | | |
| 12 | | | 5.271 | |
| 13 | | | 5.464 | 5.921 |
| 14 | 6.004 | 5.921 | 6.768 | 7.596 |
| 15 | 7.602 | 7.596 | 7.182 | 7.810 |
| 16 | 8.117 | 7.926 | | |
| Ácido Clorogenico | | 8.413 | | 8.414 |
| 18 | 8.873 | 8.663 | | |
| Ácido Caféico | | 9.175 | | 9.175 |
| 20 | 9.408 | | 9.408 | |
| Acido 4, hidroxí-3, metoxi benzoico | 9.743 | 9.745 | | |
| 22 | | | 10.619 | |
| 23 | | 11.845 | 11.100 | 11.577 |
| 24 | 12.054 | 12.535 | 11.937 | 12.170 |
| 25 | 13.661 | 13.485 | 13.272 | 13.085 |
| 26 | | | 14.371 | |
| 27 | | | 15.913 | |
| 28 | | 16.765 | 16.435 | |
| 29 | | | 17.106 | |
| 30 | | 17.969 | 17.309 | 17.422 |
| 31 | 18.152 | 18.829 | | 18.829 |
| 32 | 19.212 | 19.041 | | |
| 33 | | 20.955 | 21.154 | |
| 34 | | 23.112 | | 23.393 |
| 35 | 24.448 | 24.415 | | |

**Cuadro 2. Cromatograma por HPLC de compuestos capsaicinoides en Chile
Tiempo de retención (min)**

| No. Pico | Jalapeño | | Habanero | |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Con semilla | Sin semilla | Con semilla | Sin semilla |
| 1 | 1.244 | 1.245 | 1.245 | |
| 2 | 1.384 | 1.386 | 1.384 | 1.384 |
| 3 | | | 1.492 | 1.492 |
| 4 | | | 1.646 | 1.646 |
| 5 | 1.804 | 1.804 | | |
| 6 | | | 1.788 | 1.788 |
| 7 | | | 2.142 | 2.142 |
| 8 | 3.418 | | | |
| 9 | 4.563 | 4.563 | 4.563 | 4.563 |
| Capsaicina | 4.837 | 4.837 | 4.837 | 4.837 |
| D-hidrocapsaicina | 6.622 | 6.622 | 6.622 | 6.622 |
| 12 | | | 7.166 | 7.166 |
| 13 | 10.059 | 10.059 | | |

La identificación de estos picos es de interés en el sentido de poder identificar la ubicación de los compuestos responsables de la irritación.

Con respecto a los compuestos capsaicinoides, el número de picos detectados fue menor que los compuestos fenólicos (Cuadro 2); se detectaron tanto la capsaicina y la D-hidrocapsaicina (picos 10 y 11, respectivamente). Por otro lado, de los 13 picos detectados existen dos que están presentes solo en Jalapeño: picos 8 y 13. Estos picos están presentes en forma diferencial en el fruto y la semilla y pudieran estar relacionados, al igual que los picos diferenciales de los compuestos fenólicos, en el efecto irritante de este tipo de Chile. Los niveles de capsaicinoides detectados en Chile Habanero (MAU) concuerdan con los reportados por la literatura (Kurian y Starks, 2002).

CONCLUSIONES

Se detectaron diferencialmente picos en los cromatogramas de HPLC entre Chile con y sin semilla Jalapeño con respecto al Habanero, tanto en los compuestos fenólicos como en los capsaicinoides. Siendo que el Chile Jalapeño presenta la característica de ser altamente irritante a diferentes niveles del tracto estomacal, se presume que alguno de estos picos podría estar relacionado con ese efecto.

Se identificó la presencia de capsaicina y D-hidrocapsaicina tanto en Chile Jalapeño como en Habanero. También se identificó los ácidos clorogénico, caféico y el 4, hidroxí-3, metoxibenzoico. Este último se encuentra únicamente en Chile Jalapeño y pudiera estar relacionado con el efecto irritante.

Actualmente se está trabajando en la cuantificación de los compuestos fenólicos y capsaicinoides identificados para determinar la concentración de los mismos. En un futuro cercano los picos no identificados debido a la carencia de estándares comerciales se someterán a análisis de espectrometría de resonancia magnética nuclear protónica, de carbono trece y de masas para identificar la naturaleza química de los mismos. Asimismo, se realizará una separación de los picos para tratar de identificar aquellos posiblemente responsables de la irritación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dillard, C. J. y German, J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci. Food Agric.* 80:1744-1756.
2. Estrada, B.; Bernal, M. A.; Díaz, j.; Pomar F.; Merino Fuencisla. Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annuum* L. in Relation to Fruiting. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1188-1191.
3. Guzmán-Maldonado, S. H. y Paredes-López, O. 1998. Functional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. En *Functional Foods- Biochemical & Processing Aspects*. Mazza, G. (ed.). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. p. 293-328.
4. Kurian, A. L. y Starks, A. N. 2002. HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chile peppers. *J. Food Sci.* 67:956-962.
5. Laborde, J. A. C. y Pozo, O. 1982. Presente y futuro del chile en México. Centro de Investigaciones Agrícolas de la Península de Yucatán. Campo Experimental de Unxmal, Mérida, Yucatán. *Desplegable Técnico*. Pag. 32-39.
6. Mc Neish, R. S. 1943. Ancient Mesoamerican Civilization. *Science* 143:531-537.
7. Ramamurthy, M. S.; Maiti, B.; Thomas, P.; Nair, M. P. High- Performance Liquid Chromatography Determination of Phenolic Acids in Potato Tubers (*solanum tuberosum*) during Wound Healing. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 569-572.