UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINA A PARTIR DE CINCO ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *Capsicum* EXISTENTES EN EL ECUADOR MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA DEFINICIÓN

AUTORAS:
DIANA AURELIA BALSECA ÁLVAREZ
LORENA ANABEL RIVADENEIRA HERRERA

DIRECTOR:
CHRISTIAN F. LARENAS URÍA

Quito, julio del 2013

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE GRADO

Nosotras Diana Aurelia Balseca Álvarez y Lorena Anabel Rivadeneira Herrera autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, julio 2013

f: _____ ___	f: _____
Diana Aurelia Balseca Álvarez	Lorena Anabel Rivadeneira Herrera
CC: 1715366868	CC: 1717679540

DEDICATORIA

A nuestros Padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en nuestra educación tanto académica como personal, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A Dios, por brindarnos la oportunidad y la dicha de la vida, y los medios necesarios para continuar nuestra formación, y siendo un apoyo condicional para lograrlo, ya que, si él no hubiéramos podido.

A nuestros Hermanos, por su ayuda y apoyo incondicional que nos brindaron en los momentos que más los necesitamos, nuestros sinceros agradecimientos.

A mi Compañera de tesis, por su comprensión, ya que a pesar de todos los obstáculos que se nos presentaron logramos nuestro objetivo final.

AGRADECIMIENTO

A nuestro Director de Tesis el Dr. Christian Larenas Uría, por darnos las directrices necesarias para poder culminar este trabajo de investigación.

A la Dra. Diana Fernández, del Herbario Nacional del Ecuador, que nos brindó sus conocimientos para la identificación de las especies del género *Capsicum*.

Al Q.F. Wilson Tapia por la formación académica en el área fitoquímica, sino también por la confianza depositada en nuestra formación académica.

Al Dr. Paco Noriega Rivera, por ayudarnos a resolver los diversos problemas experimentales presentados en el área de análisis químico.

A la Ing. María Belén Aldás, coordinadora del CIVABI, quien en el trascurso de nuestra Tesis, nos dio todas las herramientas necesarias para poder realizar, de la manera más adecuada las diferentes metodologías prácticas en el laboratorio.

A la Directora de Carrera la Ing. Diana Calero, por su guía y ejemplo de formación académica, quien nos permitió adquirir conocimientos importantes en el área de Biotecnología.

Al Msc. Patricio Yánez, por su valioso aporte en el análisis de resultados del presente trabajo investigativo.

A los diferentes ayudantes de Cátedra, que con su colaboración eficiencia y paciencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I 3
GENERALIDADES 3
1.1. Justificación 3
1.2 Hipótesis 4
1.2.1. Hipótesis alternativa 4
1.2.2. Hipótesis nula 4
1.3. Objetivos 4
1.3.1. Objetivo General 4
1.3.2. Objetivos Específicos 4
CAPÍTULO II 6
MARCO TEÓRICO 6
2.1. Descripción botánica: Familia Solanaceae 6
2.1.2. Género *Capsicum* sp. 6
2.2. Origen del ají y su propagación en el mundo 8
2.3. Centro de origen del *Capsicum* en Ecuador 9
2.4. Especies del género *Capsicum* 10
2.4.1. Especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador 11
2.5. Descripción de las principales especies explotadas 12
2.5.1. *Capsicum annuum* 12
2.5.2. *Capsicum chinense* Jacq. 12
2.5.3. *Capsicum frutescens* 13
2.5.4. *Capsicum pubescens* R. y P. 13
2.5.5. *Capsicum baccatum* L. 14
2.6. Características del cultivo 14
2.6.1. Suelo 14
2.6.2. Riego 14
2.6.3. Rotación de cultivos 14
2.6.4. Épocas de siembra 15
2.6.5. Fertilización 15
2.7. Producción mundial de *Capsicum* spp. 16

2.8. Producción de *Capsicum* en el Ecuador 17
2.9. Comercialización externa 18
2.10. Importancia farmacológica del género *Capsicum* 18
2.11. Composición química y valor nutritivo del género *Capsicum* 22
2.12. Composición fitoquímica del género *Capsicum* 22
2.12.1. Alcaloides 23
2.13. Método de cuantificación para Capsaicina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 25
2.13.1. Instrumentación 27
2.13.2. Funcionamiento 27
2.13. Métodos de separación 32
2.13.1. Fase reversa 32
2.13.2. Modos de elución en HPLC 32
2.14. Selección del modo de separación de la mezcla 33
2.15. Método para determinación analítica de estándar externo 33
CAPÍTULO III. 35
MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS 35
3.1. Localización geográfica de las especies de *Capsicum* recolectadas. 35
3.2. Recolección del material vegetal 36
3.3. Control de identidad 37
3.3.1. Rocoto (*Capsicum pubescens*) 37
3.3.2. Tabasco (*Capsicum frutescens*) 38
3.3.3. Habanero (*Capsicum chinense*) 39
3.3.4. Ají cereza (*Capsicum baccatum*) 40
3.3.5. Ají ratón (*Capsicum annuum)* 41
3.5. Estudio químico cualitativo 43
3.5.1. Tamizaje fitoquímico 43
3.6. Extracción de la oleorresina 46
3.6. Cromatografía en capa fina (TLC) 47
3.6.1. Identificación de la Capsaicina de las oleorresinas por TLC 48
3.7. Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC 54
3.7.1. Lineamientos para la utilización del HPLC 54

3.7.2. Desarrollo del método 54
3.8. Método Scoville 56
3.8.1. Determinación de unidades de pungencia Scoville (SHU) 56
3.9. Análisis de Cluster 57
CAPÍTULO IV 60
RESULTADOS 60
4.1. Recolección del material vegetal 60
4.2. Control de identidad 61
4.5. Análisis microscópico (histológico) 64
4.6. Métodos físico químicos aplicados al análisis de drogas 67
4.6.1. Parámetros de control de calidad. Ensayos físico químicos cuantitativos 67
4.6.2. Tamizaje fitoquímico 70
4.6.3. Rendimiento de los extractos de las especies de C*apsicum.* 72
4.7. Identificación de capsaicina en las oleorresinas por TLC 73
4.7.1. Preparación de las muestras 73
4.8. Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC 75
4.8.1. Curva de calibración para Capsaicina 75
4.8.2. Cuantificación de Capsaicina de las cinco especies de *Capsicum* mediante HPLC .. 76
4.9. Análisis estadístico 80
4.9.1. Análisis de Varianza (ANOVA) 80
4.9.2. Análisis de Clúster 82
Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville (SHU) 86
CONCLUSIONES 88
RECOMENDACIONES 90
LISTA DE REFERENCIAS 91
ANEXOS 96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del genero *Capsicum* 6
Cuadro2. Especies domesticadas del género *Capsicum* en América 10
Cuadro 3. Usos etnobotánicos de las especies de *Capsicum* nativas en el Ecuador 11
Cuadro 4. Plagas comunes que afectan a los cultivos de *Capsicum* spp.....15
Cuadro 5. Enfermedades asociadadas a *Capsicum* spp.....16
Cuadro 6. Principales países productores de *Capsicum* spp. a nivel mundial 17
Cuadro 7. Algunas actividades farmacológicas de la capsaicina.....21
Cuadro 8. Composición química y valor nutritivo de pimientos dulces y picantes por 100 g de producto comestible 22
Cuadro 9. Solubilidad de los alcaloides. 23
Cuadro 10. Contenido de capsaicina presente en planta de *Capsicum* 25
Cuadro 11. Tipos de separación de la mezcla 32
Cuadro 12. Fuerza eluyente de los principales disolventes orgánicos utilizados en Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia 33
Cuadro 13. Sitios de recolección de las especies seleccionadas para la extracción de Capsaicina 36
Cuadro 14. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto etéreo.....44
Cuadro 15. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto etanólico.....45
Cuadro 16. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto acuoso 46
Cuadro 17. Posición de la aplicación del recorrido de las muestras para TLC.....51
Cuadro 18. Preparación de los estándares de Capsaicina para análisis de HPLC.....54
Cuadro 19. Condiciones del HPLC para la cuantificación de Capsaicina 56
Cuadro 20. Descriptores morfológicos cualitativos medidos en las plantas de *Capsicum* spp. 58
Cuadro 21. Descriptores morfológicos cuantitativos medidos en las plantas de *Capsicum* sp. 58
Cuadro 22. Parámetros de control de calidad y cuantificación de Capsaicina en *Capsicum* spp. 59
Cuadro 23. Análisis macroscópico de los frutos de las especies de *Capsicum* estudiadas 62

Cuadro 24. Análisis del contenido de materias extrañas en las especies de *Capsicum* estudiadas 63
Cuadro 25. Resumen de los valores obtenidos en los ensayos físico químicos cuantitativos de control de calidad comparados con la normas para especias y condimentos. 70
Cuadro 26. Resultados del Tamizaje fitoquímico de las especies de *Capsicum* 71
Cuadro 27. Extracción de oleorresina y cálculo del rendimiento 72
Cuadro 28. Área de los picos de las diluciones del estándar de Capsaicina 75
Cuadro 29. Concentración de capsaicina en *Capsicum baccatum* (ají cereza) 77
Cuadro 30. Concentración de capsaicina en *Capsicum chinense* (ají habanero) 77
Cuadro 31. Concentración de capsaicina en *Capsicum pubescens* (ají rocoto) 78
Cuadro 32. Concentración de capsaicina en *Capsicum annuum* (ají ratón) 78
Cuadro 33. Concentración de Capsaicina en *Capsicum frutescens* (ají tabasco) 79
Cuadro 34. Concentración de Capsaicina (mg/kg) en las cinco especies de *Capsicum* .. 81
Cuadro 35. Parámetros estadísticos para la concentración de Capsaicina en las especies de *Capsicum* 81
Cuadro 36. Cálculo del estadístico *F* para el ANOVA 81
Cuadro 37. Resultados de la Prueba de Tukey para contenido de capsaicina 82
Cuadro 38. Escala Scoville y las principales variedades de *Capsicum* spp. 86
Cuadro 39. Valores de la concentración de Capsaicina en Unidades Scoville (SHU) 87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las especies domesticadas del *Capsicum* en la época del descubrimiento de las Américas....9
Figura 2. Porcentaje de producción de *Capsicum* spp. a nivel mundial 17
Figura 3. Molécula de la Capsaicina (8-metil-N-vainil-6-nonenamida)....24
Figura 4. Esquema del proceso de análisis de Capsaicina mediante HPLC 26
Figura 5. Componentes del Sistema HPLC....27
Figura 6. Esquema de la columna cromatográfica 29
Figura 7. Celda de absorción de radiación UV visible para HPLC 31
Figura 8. Comparación de las muestras recolectados con el especímenes de *C. pubescens* encontrado en el Herbario Nacional de Quito....38
Figura 9. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. frutescens* encontrado en el Herbario Nacional de Quito....39
Figura 10. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. chinense* encontrado en el Herbario Nacional de Quito....40
Figura 11. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. baccatum* encontrado en el Herbario Nacional de Quito....41
Figura 12. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. annuum* encontrado en el Herbario Nacional de Quito....42
Figura 13. Estructura interna de los frutos de *Capsicum* 43
Figura 14. Procedimiento de extracción de la oleorresina de *Capsicum* spp.....47
Figura 15. Disoluciones de oleorresina de *Capsicum* para análisis mediante TLC. 48
Figura 16. Equipo *Linomat 5* inyectando las muestras de oleorresina de *Capsicum*....50
Figura 17. Placa cromatográfica con las muestras de oleorresina de *Capsicum*....50
Figura 18. Corrida de las muestras con la fase móvil en la placa cromatográfica....51
Figura 19. Evaporación del eluyente de la placa cromatográfica 52
Figura 20. Bandas de Capsaicina en placa cromatográfica observada a 254 nm....53
Figura 21. Placa cromatográfica observada a 352 nm 53
Figura 22. Mapa del Ecuador y ubicación de los sitios de recolección de las especies de *Capsicum*....60

Figura 23. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. baccatum* mostrando gránulos de almidón en células parenquimáticas 64
Figura 24. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. chinense* mostrando en células parenquimáticas poco diferenciadas 65
Figura 25. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. pubescens* que muestra las paredes celulares del parénquima 65
Figura 26. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. annuum* que muestra células poco diferenciadas del parénquima 66
Figura 27. Corte transversal de la pared placentaria del fruto de *C. frutescens* que muestra células parenquimáticas 66
Figura 28. Porcentaje de humedad de los frutos secos de *Capsicum* spp. 67
Figura 29. Porcentaje de Cenizas totales de las muestras de *Capsicum* spp. 68
Figura 30.Porcentaje de Cenizas Solubles en agua de las muestras de *Capsicum* spp. ... 69
Figura 31. Porcentaje de Cenizas insolubles de ácido clorhídrico 10% de las muestras de *Capsicum* spp. 69
Figura 32. Extractos etéreos para tamizaje fitoquímico 70
Figura 33. Rendimiento de oleorresina de *Capsicum* spp. 73
Figura 34. Calculo del rf., para capsaicina en placa cromatografíca observada a 254 nm. 74
Figura 35. Curva de calibración de capsaicina obtenida mediante HPLC 76
Figura 36. Concentración de Capsaicina en g/kg de fruto seco en *Capsicum* sp. 79
Figura 37. Dendograma que muestra la similitud entre las especies de *Capsicum* estudiadas 84
Figura 38. Análisis de componentes principales PCA 85

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Artículo revista *Science* 96
Anexo 2. Hoja de datos por especie para recolección 100
Anexo 3. Certificado de identificación de especies 101
Anexo 4. Certificado de pureza Capsaicina USP 102
Anexo 5. Método oficial AOAC 104
Anexo 6. Descriptores morfológicos utilizados para la caracterización de las especies de *Capsicum* sp. 106
Anexo 7. Análisis de Varianza y prueba De Tukey mediante el programa *ESTADISTIX 8.0* 109
Anexo 8. Temperaturas medias en el Ecuador. 110
Anexo 9. Cromatogramas obtenidos de la cuantificación de Capsaicina 111

RESUMEN

Los recursos genéticos de ají, son importantes por ser fuente natural de capsaicina. Los reportes sobre la amplitud de esta característica en los ajíes nativos del Ecuador son escasos. El objetivo del presente estudio fue identificar y cuantificar la capsaicina en oleorresina de las especies de género *Capsicum*, en poblaciones recolectadas en las provincias de Loja, Santo Domingo de la Tsáchilas, Esmeraldas, Los Ríos y Morona Santiago.

Se realizó un estudio farmacognósico del fruto seco de las cinco especies representativas del género *Capsicum* (*C. baccatum. C. chinense, C. pubescens, C. annuum, C. frutescens*), determinando las características macromorfológicas, los parámetros físico químicos de control de calidad de la droga, según las Normas NTE INEN 2532 (2010).

En el tamizaje fitoquímico se evidenció, la presencia de alcaloides, aceites y grasas, resinas, compuestos fenólicos, taninos, azúcares reductores, saponinas, principios astringentes y amargos. Procedimiento realizado según el Manual de Métodos de Análisis de drogas y extractos (Migdalia, 2002).

Se realizó la identificación de capsaicina mediante Cromatografía en capa fina (TLC) comparando las oleorresinas con el estándar de capsaicina USP (98,9%), obteniendo un Rf de 0,1835, la capsaicina presentó una leve fluorescencia a una longitud de onda de 254nm. La cuantificación de capsaicina fue mediante cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC). El *Capsicum chinense* presentó el rendimiento más alto con promedio de 11340 mg/kg. Se concluyó que esta especie posee un alto potencial para la extracción de capsaicina, la misma que puede ser utilizada a nivel comercial en la industria farmacológica y alimenticia.

Palabras claves: farmacognosia, capsaicina, cromatografía, nativo

ABSTRACT

Pepper genetic resources are important for being a natural source of capsaicin. The information about the magnitude of this feature in chili are scarce native Ecuador. The aim of this study was to identify and quantify capsaicin oleoresin *Capsicum* species in populations collected in the provinces of Loja, Santo Domingo de la Tsáchilas, Esmeraldas, Los Ríos and Morona Santiago.

A pharmacognosy study the dry fruit of the five representative species of the genus *Capsicum* (*C. baccatum, C. chinense, C. pubescens, C. annuum, C. frutescens*), macro morphological determining the characteristics, the physical and chemical parameters for quality control of the drug according to NTE INEN Standards 2532 (2010).

The phytochemical screening showed the presence of alkaloids, oils and fats, resins, phenolic compounds, tannins, reducing sugars, saponins, astringent and bitter principles.

Identification was performed by capsaicin Thin layer chromatography (TLC) oleoresins comparing with standard USP capsaicin (98.9%), yielding 0.1835Rf, capsaicin showed a low fluorescence at a wavelength of 254nm. Capsaicin was quantification using liquid chromatography tin (HPLC). The Capsicum chinense presented the highest yield with an average of 11340 mg/kg. It was concluded that this species has a high potential for extraction of capsaicin, the same that can be used commercially in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: pharmacognosy, capsaicin, chromatography, native

INTRODUCCIÓN

Todas las formas de ají, pimiento o chile pertenecen al género *Capsicum.* Este género se incluye en la extensa familia de las Solanáceas, la cual se encuentra dividida en dos subfamilias: *Solanoideae* y *Cestroideae. Capsicum* pertenece a la tribu más grande de la subfamilia *Solanoideae*, la tribu *Solaneae.* Esta tribu contiene alrededor de 1250 especies encuadradas en 18 géneros; entre ellos aparte de *Capsicum* hay otros géneros en los que se incluyen especies cultivadas muy importantes como: *Solanum, Lycopersicon, Cyphomandra, Physalis,* etc. (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

El ají es un cultivo de gran demanda en todo el mundo. En el Ecuador se cultivan cinco especies: *Capsicum annuum, Capsicum baccatum, Capsicum chinense, Capsicum pubescens y Capsicum frutescens*. Estudios recientes señalan que el ají tiene origen ecuatoriano según lo estableció un equipo internacional de investigadores de la Universidad de Calgary, en Canadá, y de la Universidad de Missouri en EE.UU., que publicó su trabajo en la revista *Science*. Según este estudio, los rastros más antiguos de ají fueron hallados en Loma Alta y Real Alto, península de Santa Elena, y tienen una edad aproximada de 6.100 años, mientras que los encontrados en otras zonas del continente tienen entre 5.600 y 500 años de antigüedad (Perry, y otros, 2007).

Además de su importancia como alimento, se ha reportado que la especie es utilizada como medicamento entre las comunidades indígenas de México, Centro y Sudamérica (Chávez Servia, Tuxill, & Jarvis, 2004). Cabe señalar que la medicina tradicional le atribuye propiedades irritantes, laxantes, rubefacientes y expectorantes. Se utiliza para tratar ciertas enfermedades culturales como “mal de aire y mal de ojo” y enfermedades de la piel como: la erisipela, erupciones, heridas externas, llagas infectadas, vesicante (Waizel Bucay & Camacho Morfín, 2011).

La capsaicina es el componente responsable de la sensación picante de los ajíes, la cual es utilizada como analgésico tópico. Un estudio de la Universidad de Nottingham publicado en la revista *Biochemical and Biophysical Research Communications* titulado: “Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How

vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death". Demostró que los vaniloides, la familia de moléculas a la que pertenece la capsaicina, se unen a las proteínas en la mitocondria de la célula cancerosa y genera la apoptosis, o muerte celular, sin dañar a las células sanas circundantes. La bioquímica de las mitocondrias en células cancerosas es muy diferente a la de las células normales, de ahí la gran selectividad de la capsaicina en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer (Athanasiou, y otros, 2007).

Debido a la importancia de este género tanto en el ámbito alimenticio como farmacológico, la presente investigación se basó en la aplicación de una metodología conocida para la obtención de oleorresinas con alto contenido de capsaicina (Anexo 5), así como su purificación y cuantificación, para lo cual se seleccionó el material vegetal de diversas regiones del país, se procedió a aplicar la metodología para el control de calidad de drogas establecido en el Manual de Métodos de Análisis de Drogas y Extractos (Migdalia, 2002), así se aseguró que no existiera una posible degradación de los principios activos en las muestras.

La extracción de las oleorresinas de las especies de *Capsicum* se realizó usando como solvente etanol al 96% a reflujo durante cuatro horas; posteriormente se purificó y se cuantificó cada una de las muestras mediante la técnica de cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando un estándar USP (98,9%pureza) y como fase móvil: metanol 60%, acetonitrilo 20% y agua 20%. Se obtuvo cromatogramas con tiempos de retención tanto para la muestra como para el estándar de 2,675 minutos.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Justificación

Los ajíes son originarios y domesticados en América, tienen su mayor área de diversidad en la región Andina y Amazónica de América del Sur; en el Ecuador, existen 5 especies (*Capsicum annuum, Capsicum baccatum, Capsicum chinense, Capsicum pubescens y Capsicum frutescens*) de acuerdo al Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos DENAREF, siendo *Capsicum galapagoense* la única especie endémica (Vacas Cruz, 2008).

Los frutos del ají o chile *(Capsicum* spp.) son relevantes en la alimentación humana. La planta sintetiza y acumula capsaicinoides, un grupo de alcaloides ubicados principalmente en el tejido de la placenta adyacente a las semillas y responsables del picor (Ben–Chaim, 2006). Su contenido depende del genotipo, la madurez del fruto y las condiciones de cultivo (Zewdie & Bosland, 2000). Debido a la gran diversidad y al clima que posee el Ecuador es posible que estos metabolitos tengan un buen rendimiento en las especies cultivadas. Los principales capsaicinoides son: la capsaicina y la dihidrocapsaicina que son los responsables de más de 90 % del picor (Manirakiza, 2003).

La capsaicina posee propiedades analgésicas, anti–inflamatorias, antioxidantes e incluso anti cancerígenas al inhibir el crecimiento dependiente de andrógenos en células cancerígenas de seno, colon, adenocarcinoma gástrico y de próstata (Djamgoz & Isbilen, 2006). El potencial de las especies de *Capsicum* como fuente de capsaicina en la industria farmacéutica ha promovido su estudio fitoquímico (Morán, Aguilar, Corona, Castillo, Soto, & San Miguel, 2008).

La investigación se enfocó en especies autóctonas del país, para lo cual fue necesario aplicar una metodología de obtención de dicho alcaloide mediante una maceración a

reflujo en las diferentes especies de *Capsicum* existentes para poder identificar la variedad con mayor rendimiento.

El aporte principal a la ciencia con este proyecto es la identificación de las especies con más potencial en la obtención de este metabolito para poder producirlo a gran escala, al ser éste muy cotizado por sus múltiples beneficios tanto alimentarios como farmacéuticos.

1.2 Hipótesis

1.2.1. Hipótesis alternativa

Al menos una de las especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador posee un porcentaje de Capsaicina mayor a 1%.

1.2.2. Hipótesis nula

Ninguna de las especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador posee un porcentaje de Capsaicina mayor a 1%.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Extraer y cuantificar la Capsaicina de los frutos de cinco especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador mediante cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar cinco especies de ají (*Capsicum* sp.) nativas del Ecuador que posean un elevado picor, lo cual es indicativo de la presencia de Capsaicina en los mismos.

- Obtener la oleorresina, de los frutos secos de ají de las de especies vegetales escogidas, utilizando el etanol al 96% como disolvente mediante maceración a reflujo.

- Identificar el alcaloide Capsaicina de las oleorresinas de la especies de *Capsicum* mediante cromatografía de capa fina (TLC) usando el estándar de USP (98,9%) en placas de sílica gel.

- Cuantificar del alcaloide Capsaicina a partir del análisis de la oleorresina obtenida de frutos delas especies de *Capsicum* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC**).**

- Clasificar las especies de *Capsicum* de acuerdo a la Escala Scoville, ubicándolas de acuerdo a su pungencia, con el fin de determinar la variedad de más alto rendimiento de Capsaicina en el Ecuador.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Descripción botánica: Familia Solanaceae

Las solanáceas tienen 85 géneros y unas 2300 especies. Entre las principales especies de esta familia por sus diferentes usos tenemos: *Datura stramoniun* (estramonio), *Solanum dulcamara* (dulcamara), *Solanum nigrum* (solano negro), *Atropa belladonna* (belladona) y *Hyocyamus niger* (beleño). Se cultivan muchas especies tropicales y subtropicales con fines agrícolas y ornamentales, por ejemplo *Solanum tuberosum* (papa), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Trease, 1998).

2.1.2. Género *Capsicum* sp.

Según K.V. Peter (2008), la más reciente clasificación taxonómica es:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del genero *Capsicum*

Reino :	**Plantae**
División:	Magnoliophyta
Clase:	MAGNOLIOPSIDA
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	*Capsicum*

Fuente: (Peter, 2008)

Nombres Colectivos: Ají (Suramérica); Chile (México); rocoto (Ecuador y Perú); uchu (Perú y Bolivia); guindilla (España); pepper (USA); piment (Francia); pimienta (Portugal) (León, 2000).

Las especies del género incluyen todas las variedades picantes (ajíes), como las especies dulces (pimiento). EL nombre científico del género deriva del griego *Kapso* (picar) o *Kapsakes* (cápsula). Es económicamente muy importante y en la horticultura se han desarrollado numerosas variedades (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

2.1.2.1. Descripción Botánica

Son plantas herbáceas de diferente tamaño, con un período de vida generalmente menor a un año. Crecimiento simpodial: los tallos y ramas se forman de sectores en cuyo nudo superior hay, por lo general, yemas floríferas y dos ramillas que forman un dicasio, una de ellas más desarrollada que la opuesta. La rama más grande continúa el crecimiento y en su nudo superior se repite la norma de inflorescencia y ramas. Hojas generalmente elípticas, con el ápice agudo y la base asimétrica con variaciones entre especies (Vacas Cruz, 2008)

Presenta dos flores por nudo, rara vez una flor, con pedicelos erectos o doblados en la antesis. El cáliz es cupular, glabro, con los dientes muy cortos y prominentes. La corola es amarillo verdosa, ocasionalmente entre blanco lechoso o morado y las anteras azules. El cáliz de los frutos maduros generalmente presenta una constricción anular en la unión con el pedicelo; márgenes doblados hacia arriba. El fruto es de pulpa firme, rojo o amarillo, a veces, blanco (Vacas Cruz, 2008).

2.1.2.2. Etnobotánica del género *Capsicum*

Según García Barriga (1992) se usa el jugo o la tintura del fruto por vía oral contra las hemorroides. También cita que se recomienda la tintura de los diversos frutos de *Capsicum* en la gota, en los reumatismos y en la bronquitis.

En el Perú se aconseja el consumo en las comidas por sus efectos digestivos, colagogos y carminativos. Para aprovechar las propiedades analgésicas y rubefacientes, el fruto y las semillas deben ser macerados en el alcohol al 70% y el líquido resultante se debe aplicar como linimento en las zonas del cuerpo afectadas (Garcia-Barriga, 1992).

En Bolivia la Farmacopea Callawaya utiliza numerosas formas farmacéuticas para diversas indicaciones destacando como antisépticas y rubefacientes. Externamente se usa como revulsivo en pomadas y linimentos contra los dolores reumáticos y las neuralgias (Oblitas, 1992).

Por vía tópica, el pimiento se utiliza tradicionalmente en el tratamiento sintomático de manifestaciones articulares dolorosas menores (Vega, 2001).

2.2. Origen del ají y su propagación en el mundo

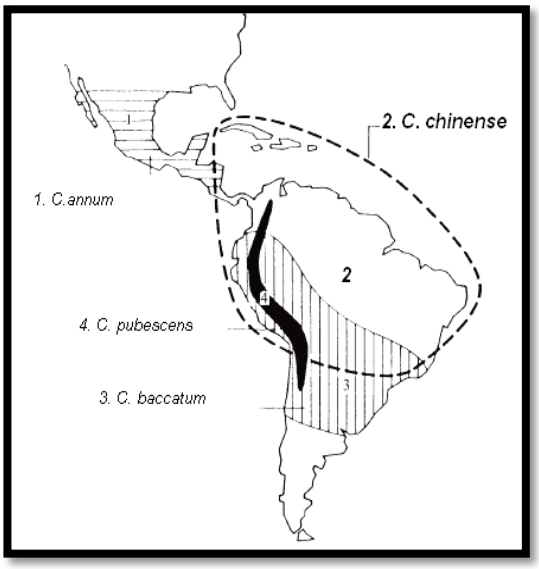
Los botánicos, especialistas en el tema, concuerdan en afirmar que el género *Capsicum* es una planta nativa de las zonas tropicales del Nuevo Mundo y que su centro de origen se localiza en el centro de Sudamérica en los altos de Bolivia o en una zona montañosa del sur de Brasil donde se encuentran 11 especies silvestres (Pickersgill, 2007).

Los ajíes son originarios y domesticados en América, tienen su mayor área de diversidad en la región Andina y Amazónica de América del Sur (Bolivia y el sur de Brasil) (Vacas Cruz, 2008).

La botánica inglesa Bárbara Pickersgill opina que las especies silvestres de *Capsicum* probablemente fueron domesticadas en diferentes épocas, en un periodo que comprende 6000 años. No obstante, hay restos arqueológicos de chiles domesticados con fechas anteriores al año 2000 a.C. Los especialistas especulan que cada una de las especies fueron domesticadas en forma independiente, en diferentes zonas geográficas, antes de la llegada de los europeos en el siglo XV (Pickersgill, 2007).

Cuando llegaron los españoles al Nuevo Mundo, a fines del siglo XV, el *Capsicum* llevaba miles de años de ser domesticado y difundido desde su centro de origen, como indica el mapa trazado por Charles Heiser, mostrando la distribución de las especies del *Capsicum* en la época de la llegada de los europeos (véase Figura 1) (Towell, 2005).

Figura 1. Distribución de las especies domesticadas del *Capsicum* en la época del descubrimiento de las Américas



Fuente: (Towell, 2005)

2.3. Centro de origen del *Capsicum* en Ecuador

Investigaciones bibliográficas científicas recientes señalan que el ají o pimiento picante tiene origen ecuatoriano según descubrió un equipo internacional de investigadores de la Universidad de Calgary, en Canadá, y de la Universidad de Missouri en EE.UU., que publicaron su trabajo en la revista *Science*. Según este estudio, los rastros más antiguos de ají fueron hallados en Loma Alta y Real Alto, península de Santa Elena, y tienen una edad aproximada de 6.100 años, mientras que los encontrados en otras zonas del continente tienen entre 5.600 y 500 años de antigüedad. Luego el pimiento picante fue llevado a Europa. El rastreo de este famoso condimento, que tiene una gran cantidad de variaciones, especialmente en México, se llevó a cabo a partir de microfósiles de almidón recuperados, piedras, sedimentos y recipientes de cerámica para cocinar. (El ají nació en el Ecuador, 2007).

Los hallazgos, que se divulgan en el artículo "Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (Capsicum spp.L.) in the Americas" de la revista *Science*,

revelan que las variedades comunes de pimientos picantes, de la especie *Capsicum*, se usaban profusamente desde las Bahamas hasta el sur de Perú (Perry, y otros, 2007).

Pero según el estudio, Ecuador es el lugar más antiguo el que se hallaron granos de almidón de pimientos picantes, de entre siete sitios donde se encontraron rastros de este alimento en América (Véase Anexo 1).

2.4. Especies del género *Capsicum*

En toda América existen más de 26 especies, de las cuales 12 son aprovechadas por el ser humano, y de estas solo cinco son cultivadas y domesticadas Cuadro 2.

Cuadro2. Especies domesticadas del género *Capsicum* en América

Especies domesticadas	Nombre Común
***C. annuum* L**	Serrano, jalapeño
***C. baccatum* L. var. *pendulum* (Wild)**	Amarillo, cristal
***C. chinense* Jacq.**	Habanero
***C. frutescens* L.**	Tabasco
C. pubescens	Manzano

Fuente: **(Pickersgill, 2007)**

En el informe, 2008 sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación - en colaboración con Ing. Cesar Tapia, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología DENAREF en el Ecuador, se publicó que existen 9 especies (*Capsicum annuum, Capsicum baccatum, Capsicum chinense, Capsicum dimorphum, Capsicum galapagoense, Capsicum hookerianum, Capsicum lycianthoides, Capsicum pubescens y Capsicum rhomboideum)* y más de 60 variedades tradicionales en cultivo, estando *Capsicum galapagoense* como la única especie endémica; siendo las especies nativas cultivadas de ají en el país (*C. annuum, C. baccatum, C. chinense, C. pubescens y C. frutescens*) que se utilizan tradicionalmente como agregados naturales para realzar el sabor de los alimentos. En las diferentes comidas ecuatorianas este tipo de sabores le dan una identidad única (Bruneton, 2001).

2.4.1. Especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador

Alfredo Paredes, botánico y químico, publicó: *Plantas usadas por nuestros aborígenes* (1955), donde se citan las siguientes especies nativas del género C*apsicum* en Ecuador.

Cuadro 3. Usos etnobotánicos de las especies de *Capsicum* nativas en el Ecuador

Especies del género *Capsicum* nativas del Ecuador						
	***Capsicum annuum* L.**	***C. annuum* var. *Annuum***	***Capsicum cerasiforme* Willd.**	***Capsicum chinense.* Jaca.**	***Capsicum pubescens.* Ruiz&Pav.**	***Capsicum rhomboideum*** (Kunth) Kuntze
Hábito	Hierba terrestre, subarbusto o arbusto.	Hierba terrestre, subarbusto	Arbusto	Hierba terrestre	Arbusto	Hierba terrestre o subarbusto
Origen	Nativa. Cultivada	Nativa. Cultivada	Nativa. Cultivada	Cultivada	Nativa Cultivada	Nativa
Nombre común	Uchú muyu, (Kichwa), yaa jimia (shuar), ají rocoto, (castellano).	Pia, suara pia (pai coca), ají (castellano)	Mutu uchú (Kichwa)	Pui jimia (shuar chicham), ají gallinazo	uchú (Kichwa), jaijoropia (pai coca), ají rocoto (castellano).	Hierba dura, hierba mora, siete varas (castellano)
Etnias	Awa, Chachi, Kichwa de la Sierra y del Oriente, Cofán, Siona, Shuar, Secoya.	Secoya	Kichwa	Cofán, Secoya, Siona, Kichwa del Oriente, (Sucumbíos, Orellana), Shuar	Kichwa de la Sierra-Loja, Secoya, etnias del Cañar y Azuay.	Con el tallo se elabora los aros de los tambores (Imbabura Pichincha)
Usos	**Alimenticios:** Condimento picante **Materiales**: la planta, después de quemarla sirve para eliminar los gusanos del techo. **Social:** Recuperarse de los desmayos. Los Shamanes hierven los frutos y bañan a las personas (Wao-Napo). **Tóxico:** el fruto es insecticida **Medicinal:** Digestivo y contra parásitos.	**Alimenticios:** El fruto es comestible. Se utiliza como condimento	**Alimenticios:** El fruto es comestible	**Alimenticios:** Fruto y hojas comestibles, condimento. **Materiales**: Elimina los gusanos del techo **Tóxico:** Insecticida. **Medicinal:** Fruto es cardiotónico y para la tos e infecciones de los ojos. Las hojas para el dolor de las articulaciones y bajar la temperatura.	El fruto es comestible, condimento **Social:** El fruto, en masajes corporales, alivia el dolor de cabeza. **Medicinal:** Las hojas calientes se aplican para tratar la mordedura de los perros, Kichwa de la Sierra-Loja.	**Materiales:** Con el tallo se elaboran los aros de los tambores **Toxico:** Fruto Se usa para tratar granos (etnia no especificada – Pichincha).

Fuente: (Paredes, 1955)

2.5. Descripción de las principales especies explotadas

2.5.1. *Capsicum annuum*

Esta es la más variable de todas las especies del género y la más ampliamente cultivada; sólo en México se conoce más de 100 variedades. Incluyen tanto formas picantes como dulces. Se distinguen por sus flores de corola blanca o amarillenta, con anteras azules o purpúreas. Los frutos aparecen en las axilas de las hojas o ramillas, por lo común solitarios. Los pedicelos son cortos o largos, erectos o pendientes. Las semillas son de color claro. No hay pubescencia en el tronco y follaje. Esta especie se halla distribuida especialmente en América del Norte y Central y su domesticación se sugiere debió estar en México (León, 2000).

2.5.2. *Capsicum chinense* Jacq.

La especie de ají conocido botánicamente con la nomenclatura taxonómica de *Capsicum chinense*, es conocido en la península de Yucatán y Belice con el apelativo de "chile habanero". Esta especie se caracteriza por ser la más picante de todas las especies de *Capsicum*. La planta de la especie crece a una altura de 40 a 75 centímetros, según los factores ambientales; en climas tropicales puede llegar a medir hasta dos metros. El cáliz carece de dientes, pero presenta una indentación marcada entre la base y el pedúnculo. Esta es la única característica morfológica que la separa de la especie *frutescens* y no se encuentra presente en todos los casos. La planta produce de dos a seis frutos por nudo, de forma esférica o alargada y de gran variación en el tamaño. Los frutos inmaduros se presentan de color verde y van adquiriendo un tono anaranjado, amarillo, salmón, rojo o café al madurar. El fruto tiene un aroma característico que algunos consumidores relacionan con el olor del albaricoque y que se considera una característica distintiva. Como las demás especies de *Capsicum* este chile se originó en América del Sur, en los altos de Bolivia o en el sur del Brasil. De esta zona llegó, por dispersión natural, a las tierras bajas de la Cuenca Amazónica en el Brasil, considerado por los botánicos como su centro de diversificación (Peter, 2008).

2.5.3. *Capsicum frutescens*

Las plantas cultivadas miden entre 40 y 75 centímetros, tienen dos o más pedúnculos por nódulo y cáliz truncado o ligeramente dentado. Como planta silvestre, produce pequeños frutos rojos, parados en las ramas, que se separan del cáliz con facilidad. Esta pequeña fruta y el hecho que sea caduca ayuda a su dispersión por los pájaros. El fruto de las plantas semidomesticadas crece tanto en posición erecta como colgante, y tiene una gran variedad de formas. Es de color verde o amarillo, en su estado tierno, y se convierte en un tono rojo vivo al madurar. Es un chile muy picante que posee varias características en común con el *C. chinense*, pero se diferencia en el número de frutos por nudo axilar y en la constricción circular en la base, rasgo distintivo del *C. chinense* y ausente en el *C. frutescens.* El *C. frutescens* cultivado más conocido comercialmente es el tipo Tabasco, utilizado como base de la famosa salsa del mismo nombre (Heiser, 1964).

La distribución geográfica del *C. chinense* y *C. frutescens* es similar en América del Sur, y las dos especies cuentan con muchos caracteres comunes. La especie crece como una planta espontánea, tolerada o semi-domesticada en tierras bajas, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina. Los especialistas calculan que su centro de origen, como especie, haya sido en la cuenca amazónica (Towell, 2005).

2.5.4. *Capsicum pubescens* R. y P.

Especie que se puede distinguir de las anteriores por las flores de color púrpura, por tener un fruto en cada axila y semillas de color morado o negro. Las hojas son pubescentes y rugosas. Se cultiva principalmente en la región occidental de los Andes pero se ha extendido hasta México. El tipo principal es el ají Rocoto (León, 2000).

Según el botánico W. Hardy Eshbaugh su centro de origen se encuentra en Bolivia, en la zona del río Mizque, entre Cochabamba y Sucre. La especie está aislada genéticamente de las otras especies aquí tratadas y no se puede cruzar con ninguna de ellas (McLeod & Guttman, 2001).

2.5.5. *Capsicum baccatum* L.

Planta herbácea, periodo de vida menor a un año, crecimiento simpodial, los tallos y ramas cuyo nudo superior, hay por lo general, yemas floríferas y dos ramillas que forman un dicasio. Hojas generalmente elípticas, con ápice agudo y base asimétrica. Dos flores por nudo rara vez solitaria, pedicelos erectos. El cáliz es cupular, glabro con dientes muy cortos y prominentes. Corola amarilla verdosa, ocasionalmente entre blanco, anteras azules. Fruto de pulpa firme, rojo o amarillo y a veces blanco (Farinango Cervantes, 2007).

2.6. Características del cultivo

2.6.1. Suelo

Los mejores suelos para el cultivo de ají son los de textura suelta o ligeramente arcillosa (franco- franco arcillosos), bien nivelados y con un alto contenido de materia orgánica y pH entre 5.5 y 7.0. En caso de riego por goteo, los suelos arenosos son factibles para el cultivo de ají, pues llegan a obtenerse altos rendimientos y excelente calidad (FDA, 1994).

2.6.2. Riego

Se debe lograr una humedad en el suelo de 90% de la capacidad de campo hasta fructificación y 80% en período restante, insuficiente humedad trae como consecuencia detención del crecimiento, caída de flores y de los frutos, frutos pequeños y deformes (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

2.6.3. Rotación de cultivos

Se recomienda al cabo de 4 a 5 años del cultivo de ají, se repita la siembra en el mismo lugar. Sin embargo razones económicas obligan a que nuestros agricultores sólo esperen un año, lo que se traduce en la presencia de insectos y enfermedades difíciles de curar. El tiempo mínimo con buenas mediadas culturales para repetir el cultivo debe ser de 3 años (León, 2000).

2.6.4. Épocas de siembra

En la mayoría de las zonas productoras de ají del país las épocas de siembra y producción están entre el período de Septiembre a Marzo, pero las condiciones óptimas climáticas se puede cultivar todo el año (Heiser, 1964).

2.6.5. Fertilización

Los más altos rendimientos y la mejor calidad de ajíes se obtienen mediante la satisfacción de los requerimientos nutricionales de las plantas. Debido a la variación de suelos y a la capacidad nutritiva en las zonas productoras de ajíes, se recomienda programas de fertilización sean precedidos y sustentados por análisis de suelos. Generalmente se utiliza a nivel comercial 300-500 kg/ha de la fórmula 12-24-12 (FDA, 1994).

Cuadro 4. Plagas comunes que afectan a los cultivos de *Capsicum* spp.

Plagas de *Capsicum* spp.			
Comunes: acaro hialino, comedores de hojas y frutos, gusanos de tierra mosca blanca, mosquilla de los brotes, nematodos y pulgones.			
Especificas	Descripción	Daños	Medidas de manejo
1. Enrollador de hojas	*Lineodes integra* Larva verde claro, de hasta 16 mm, con cabeza amarilla y cubierta de pelos finos	Inicialmente esquelitiza hojas, luego las enrolla para empupar.	- Densidad de siembra adecuada - Evitar siembras escalonadas - Insecticidas: cartap, cipermetrina, clorfluazuron, clorpirifos, metomil, tiociclamhidrogenoxaloto, teflubenzuron
2. Gusano perforador del fruto	*Symmestrichema capsicum* Larvas cremosas de hasta 6 mm, cabeza oscura con bandas transversales marrones o rojas.	Perforan y barrenan los botones florales y los pétalos permanecen cerrados. En frutos destruyen las semillas	- Evitar siembras escalonadas - Trampas de luz - Recolección y destrucción de frutos infestados - Cosechas oportunas - Prestar especial atención al periodo de carencia de los insecticidas - Insecticidas: betaciflutrina, cipermetrina. clorfenapir, deltametrina, flufenoxuron.

Fuente: (Ugas, Delgado de la Flor, Casas, & Toledo, 2000)

Cuadro 5. Enfermedades asociadadas a *Capsicum* spp.

Enfermedades que afectan a *Capsicum* spp.			
Comunes: chupadera, marchitez, virosis			
1. Marchitez bacteriana	*Ralstonia* (=*Pseudomonas*) *solanacearum*	Marchitamiento rápido de la planta, amarillamiento y defoliación.	- Predomina en climas cálidos y húmedos - Evitar heridas en la planta - Eliminación de plantas enfermas - Evitar humedad excesiva en el riego y asegurar buen drenaje - Rotación de cultivos y buena nutrición de la planta - Eliminación de rastrojos
2. Pudrición radical, marchitez o Wilt	*Phytophtora capsici*	Clorosis y desecación del follaje, quedando los tallos erectos y los frutos prendidos de la planta	- Rotar cultivos - Usar cultivares resistentes - Usar semillas sanas y desinfectadas - Buena nutrición del cultivo - Evitar humedad excesiva en el riego y asegurar buen drenaje - Alejar el riego del pie de la planta - Eliminar plantas enfermas y restos de cosecha
3. Escaldadura	Desorden fisiológico	Ampollas en frutos, que pierden su valor comercial	- Evitar insolación directa de los frutos sembrando cultivares con buena cobertura de follaje - Controlar enfermedades para evitar la caída de las hojas.
4. Pudrición apical del fruto	Desorden fisiológico	Mancha negra seca en la porción basal del fruto, causada por deficiencia aparente del calcio y riego insuficiente	- Predomina en época cálida - Riegos adecuados - Evitar exceso de fertilización nitrogenada, especialmente en forma de amonio - Uso de abonos foliares con calcio

Fuente: (Ugas, Delgado de la Flor, Casas, & Toledo, 2000)

2.7. Producción mundial de *Capsicum* spp.

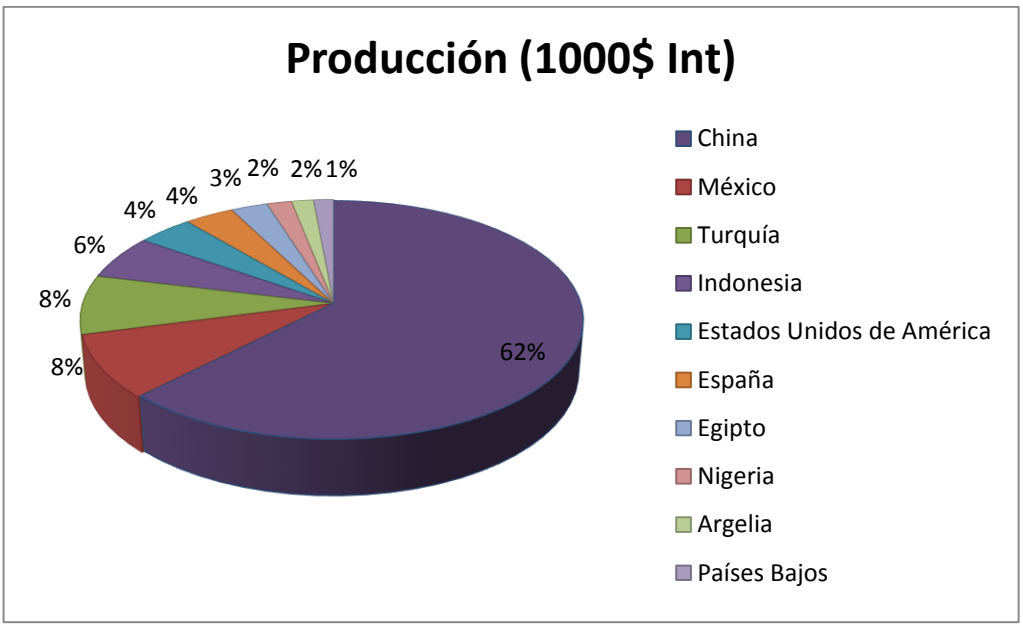
Según la FAO (2011), la producción de Chiles, pimientos picantes, y pimientos verdes alcanza una producción de *Capsicum* en China 15.545.683 toneladas que representa alrededor de $7.318.254. Asia es el continente donde más se lo cultiva, México y Turquía junto con Indonesia son los principales países productores.

Cuadro 6. Principales países productores de *Capsicum* spp. a nivel mundial

Posición	Región	Producción (1000$ Int)	Producción (T)
1	China	7318254	15545683
2	México	1003533	2131740
3	Turquía	929874	1975270
4	Indonesia	698171	1483080
5	Estados Unidos de América	479462	1018490
6	España	422863	898260
7	Egipto	315612	670434
8	Nigeria	211649	449594
9	Argelia	188303	400000
10	Países Bajos	171826	365000

Fuente: **FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2013 | 08 junio 2013**

Figura 2. Porcentaje de producción de *Capsicum* spp. a nivel mundial



Fuente: FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2013 | 08 junio 2013

2.8. Producción de *Capsicum* en el Ecuador

Los productores de ají de una parte de la costa ecuatoriana consolidaron en el año 2009 su producción de ají para la exportación. Alrededor de 285 campesinos conforman la red

productiva para el uso de buenas prácticas agrícolas. Ellos forman la cadena productiva del ají que está integrada por agricultores de Santo Domingo de los Tsáchilas, La Unión (Esmeraldas), Los Ríos, Pedernales (Manabí) y Chongón (Guayas).

En el Ecuador se estima que se siembra alrededor de 1649 Hectáreas con una producción que bordea los 5334 toneladas y un rendimiento promedio de 32347 Ttoneladas por Hectárea (FAO, 2012).

2.9. Comercialización externa

De acuerdo a los datos del Banco Central del Ecuador, las exportaciones al año 2007 (enero-diciembre) de frutos del género *Capsicum* frescos o refrigerados (en la partida arancelaria 0709600000 se incluye a la pimienta) fueron de 260,64 toneladas con un valor FOB de USD 201 mil dólares, los mercados más importantes fueron Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Japón, entre otros.

2.10. Importancia farmacológica del género *Capsicum*

Desde hace mucho tiempo, los frutos de *Capsicum* se utilizan como remedio natural contra la tos, el resfriado (catarro), la sinusitis y la bronquitis. La composición química de la capsaicina se parece a un medicamento llamado Guaifenesina, el cual se encuentra en muchos remedios contra el resfriado. Cuando el picante toca la boca un sinnúmero de mensajes nerviosos atacan al cerebro. Este a su vez estimula las glándulas productoras de secreciones a lo largo de las vías respiratorias, por lo que los ojos y la nariz se inundan de líquidos, se aflojan las mucosidades en los pulmones. Por lo tantos son descongestivos y expectorantes naturales (Yeager, 2002).

La aplicación de capsaicina sobre la piel o mucosas produce un dolor de ardor e hiperalgesia, pero la aplicación repetida da lugar a perdida de sensibilidad a la capsaicina, y dosis más elevadas causan un bloqueo de las fibras C que conducen a un déficit sensorial de larga duración. Esta propiedad ha sido utilizada terapéuticamente en el dolor neuropático como una opción cuando los otros fármacos son ineficaces. Así la capsaicina ha demostrado su eficacia después de la administración repetida en el dolor postmastectomía, el dolor del muñón, la distrofia simpática refleja, el dolor neuropático

oral, la fibromialgia y sobre todo en la neuropatía diabética y la neuralgia postherpética. En consecuencia existe un elevado interés en encontrar nuevos medicamentos análogos a la capsaicina (Muriel, 2007).

Según el Doctor Irwin Ziment (2002), Profesor de Medicina de la Universidad de California en los Ángeles. Existen ciertas pruebas de que en los frutos de *Capsicum* spp., ayudan a bajar el índice de colesterol lipoproteínico de baja densidad (o LDL por sus siglas en ingles), cuya presencia va de la mano con derrames cerebrales, hipertensión y enfermedades cardiacas. Además aunque parezca mentira hay ciertos indicios de que este no agrava las úlceras estomacales, sino que las previene. Al parecer la capsaicina estimula la producción de jugos digestivos, lo cual protege las paredes estomacales de los ácidos y del alcohol que causan las úlceras. Esta circunstancia los llevo a especular que la capsaicina sirve como agente protector del estomago (Yeager, 2002)

Los chiles al parecer también sirven para hacer menos espesa la sangre. Algunos investigadores del Instituto Max Planck en Alemania descubrieron que el chile aumenta el tiempo necesario para que se coagule la sangre, impidiendo de esta manera la formación de coágulos en la sangre que provocan ataques cardiacos y derrames cerebrales (Yeager, 2002).

La investigación, dirigida por el profesor Jong Won Yun (2010) 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.

El estudio incluyó la alimentación de ratas con una dieta alta en grasas, junto con un grupo al que también se le administró un tratamiento con capsaicina. Las ratas estimuladas con capsaicina perdieron un 8% del peso corporal en comparación con las ratas no alimentadas con capsaicina y sólo alimentadas con la misma dieta. Es importante destacar que esta investigación también demostró que las ratas alimentadas con capsaicina mostraron cambios en la expresión de más de 20 proteínas clave para el procesamiento de los lípidos.

El equipo de investigación de Corea también encontró que la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) y la malato deshidrogenasa (MDH) fueron significativamente reguladas a la baja por la capsaicina, lo que resultó en una reducción de la actividad glucolítica y en una menor síntesis de grasa en general. La capsaicina también parece tener un efecto importante en los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), un gen que comúnmente se sobre expresa en muchas células de grasa. En este estudio, el gen TNF-a fue significativamente regulado al alta en las ratas con una dieta rica en grasas, y sus niveles se redujeron notablemente una vez más en las ratas en tratamiento con capsaicina (Joo, Kim, Choi, & Yun, 2010).

Científicos británicos de la Universidad de Nottingham descubrieron que la capsaicina, el componente que da el sabor picante a muchos frutos del genero *Capsicum* (ají) tiene potentes efectos anti cancerígenos. En su investigación, publicada en la versión de internet de la revista "*Biochemical and Biophysical Research Communications*", los científicos constataron que la capsaicina es capaz de eliminar las células malignas atacando la fuentes de energía que las alimenta. Demostró que los vaniloides, la familia de moléculas a la que pertenece la capsaicina, se unen a las proteínas en la mitocondria de la célula cancerosa y genera la apoptosis, o muerte celular, sin dañar a las células sanas circundantes. La bioquímica de las mitocondrias en células cancerosas es muy diferente a la de las células normales, de ahí la gran selectividad de la capsaicina en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer (Athanasiou, y otros, 2007).

Cuadro 7. Algunas actividades farmacológicas de la capsaicina

EFECTO	PADECIMIENTO	MECANISMO IMPLICADO	REFERENCIA
Analgésico	*Artrosis *Dolor muscular *Fibromialgia *Lumbalgia inespecífica *Neuralgias pos-operatorias *Neuropatía diabética *Neuropatía periférica *Osteoartritis *Regeneración de fibras nerviosas periféricas	La capsaicina 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	(Valencia *et al*, 2005) (Mora, 2008) (Zhang, Li, 1994)
Antiagregante plaquetario			(Morron, *et al*, 2007)
Antiinflamatorio	*Enfermedad intestinal inflamatoria *Neuritis *Pulpitis	Controla la inflamación neurogénica y disminuye los neuropéptidos de la sinapsis neural	(Zhang, Li, 1994)
Antimicrobiano		Retarda el desarrollo de peroxidasas y ácidos grasos que son esenciales para el desarrollo bacteriano.	(Domingo, 2003)
Aparato respiratorio	*Expectorante *Prevención de la neumonía *Rinitis alérgica	Bloquea la acción de neuropéptidos, contra el reflejo axonal y puede tener efecto curativo sobre rinitis alérgica	(Cheng, 2008)
En el proceso de cicatrización	*Heridas quirúrgicas *Pulpotomía	Regeneración pulpar *in vitro* Induce proliferación celular de fibroblastos	(Moreno, 2002)
En odontología	*Boca ardorosa *Dolor dental *Dolor masticatorio *Neuralgia del trigémino *Procesos neoplásicos en aparato estomatognático	La capsaicina favorece la eliminación de la sustancia P, responsable de los mecanismos nerviosos que participan en la transmisión del dolor.	(Valencia *et al*, 2005) (Martorell, *et al*, 2004: UNAN, 2008)
Sobre sistema urinario	*Vejiga hiperactiva		(Dasgupta, *et al*,1997)

Fuente: (Waizel Bucay & Camacho Morfín, 2011)

2.11. Composición química y valor nutritivo del género *Capsicum*

El contenido nutricional de los frutos de *Capsicum* es alto en comparación con otras hortalizas de amplio consumo (Grubben, 1977).

Cuadro 8. Composición química y valor nutritivo de pimientos dulces y picantes por 100 g de producto comestible

Composición	*Pimiento dulce*	*Pimiento picante*
Materia seca (%)	8,0	34,6
Energía (kcal)	26,0	116,0
Proteína (g)	1,3	6,3
Fibra (g)	1,4	15,0
Calcio (mg)	12,0	86,0
Hierro (mg)	0,9	3,6
Carotenos (mg)	1,8	6,6
Tiamina (mg)	0,07	0,37
Rivoflavina (mg)	0,08	0,51
Niacina (mg)	0,8	2,5
Vitamina C (mg)	103,0	96,0
Valor nutritivo medio (ANV)	6,61	27,92
ANV por 100 gramos de materia seca	82,6	80,7

Fuente: (Grubben, 1977)

2.12. Composición fitoquímica del género *Capsicum*

Dentro de las angiospermas, en las dicotiledóneas se pueden encontrar familias en las que abundan los alcaloides como es el caso de la Familia Solanácea a la cual pertenece el género *Capsicum* (Trease, 1998).

Los ajíes son ricos en ácido ascórbico: contienen igualmente heterósidos diterpénicos (capsianósidos) y un heterósido del furostanal (capsicósido). Su coloración se debe a la presencia de carotenoides con terminación ciclopenténica cuyo contenido aumenta a lo largo de la maduración: la capsantina es una 3,3” –dihidroxi-β, κ-caroten-6,6’-ona- se encuentra acompañado de capsorubina, capsantinona, criptocapsina, violaxantina, α-caroteno. El sabor picante de los pimientos fuertes y picantes se debe al contenido muy variable en amidas: los capsaicinoides. El compuesto mayoritario de esta serie es la capsaicina, vainillamida del ácido 8-metil-non-6-enoico. El contenido en capsaicinoides, muy bajo en los pimientos morrones, puede sobrepasar el 1 % en las especies muy picantes (Bruneton, 2001).

2.12.1. Alcaloides

Los alcaloides son químicamente y biológicamente muy heterogéneos, son compuestos orgánicos que en los vegetales, proceden del metabolismo secundario y se forman a partir de aminoácidos. Son sustancias nitrogenadas con carácter básico. En las especies vegetales suelen estar localizados en tejidos periféricos: corteza, raíces, hojas frutos y semillas (Sharapin, 2000).

La palabra alcaloide fue aplicada inicialmente a la mayoría de las sustancias de origen natural y de carácter básico. Es en cierto modo difícil dar una definición precisa, ya que no existe una clara distinción entre alcaloides y aminas complejas (Trease, 1998).

2.12.1.1. Función de los alcaloides en las plantas

La función fitoquímica de los alcaloides para la planta que los produce radica en que constituyen reservorios de nitrógeno para ella, al mismo tiempo, pueden actuar como sustancias alelopáticas o como disuasorios alimentarios, con lo que contribuyen a la defensa del vegetal, frente a la competencia con otras especies vegetales o al ataque de determinados patógenos o depredadores (Tazón & Azcón Bieto, 2008).

2.12.1.2. Estructura química de los alcaloides

Todos los alcaloides contienen C, H y N. Algunos tienen oxígeno y poco azufre. El nitrógeno que contienen puede formar parte de un heterocíclico que es lo habitual o puede formar parte de una cadena alifática en cuyo caso estará clasificado con un protoalcaloide (Trease, 1998).

Cuadro 9. Solubilidad de los alcaloides**.**

Alcaloide	Agua	Alcohol	Mezcla HA	Disolvente orgánico apolar
Base Libre	Insoluble	Soluble	Soluble	Soluble
Sal	Soluble	Soluble	Soluble	Insoluble

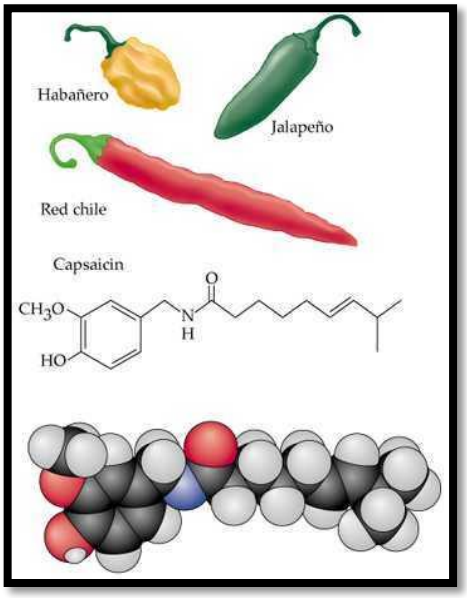
Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

En esta compleja y heterogénea composición química se encuentra incluido los capsaicinoides que son los principios activos y componentes picantes del género *Capsicum* de la familia de las Solanáceas (Seguí Simarro, 2010).

2.12.1.3. Capsaicina

Es una sustancia de naturaleza alcaloide. Más concretamente un protoalcaloide, cuya fórmula empírica es $C_{18}H_{27}NO_3$. En la actualidad se sabe que la capsaicina no es un compuesto simple, si no que se trata de una mezcla de varias amidas, que son comúnmente conocidas como capsaicinoides, siendo la capsaicina la más importante entre ellas (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

Figura 3. Molécula de la Capsaicina (8-metil-N-vainil-6-nonenamida)



Fuente: (López Aguilera, 2012)

Es el capsaicinoide mayoritario presente en las variedades picantes del género *Capsicum*, son aminas simples con nitrógeno extra cíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos; es un alcaloide oxigenado, en cuyo caso de manera pura se encuentra como un sólido cristalizable, incoloro y blanco (Navarro Albaladejo & Costa García, 2000).

El contenido de capsaicina es mayor en la placenta y en el septo, en donde representa un 2.5% de la materia seca, mientras que el contenido del fruto es del 0.6%, el de las

semillas del 0.7% y del pericarpio del 0.03%. (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

Cuadro 10. Contenido de capsaicina presente en planta de *Capsicum*

	Por 100 g de Chile	Masa de capsicina (g)	mg capsicina / g chile	% de capsicina
PERICARPIO	38	0.22	2.20	51.80
PLACENTA	2	0.15	1.54	36.20
SEMILLA	56	0.05	0.51	12.00
TALLO	4	0	0	0

Fuente: (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003)

El contenido en capsaicina de los frutos varía notablemente, en una magnitud del 1,5% y está influido por las condiciones ambientales y la edad del fruto. (Trease, 1998)

La formación de la capsaicina se incrementa a temperaturas mayores de 30◦C que a temperaturas menores (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

2.12.1.4. Biogénesis de la Capsaicina

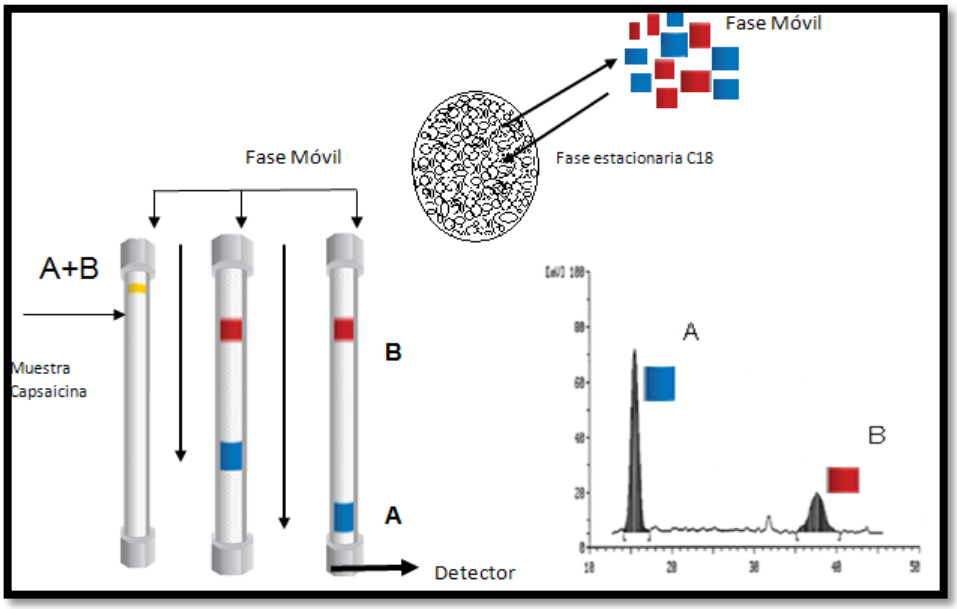
Los trabajos de Leete y Louden sobre el *C. frutescens* y de Bennet y Kirby sobre el *C. annuum*, han demostrado que la fenilalanina se incorpora a la unidad vanillilo C_6-C_1 de la capsaicina dando el C-3 de la fenilananina el grupo metilo de los residuos de la vanillilamina; la incorporación ocurre probablemente vía ácidos cinámico *p*-cumárico, cafeíco y protocatéquico. La tirosina no parece ser un precursor probable. Los experimentos de nutrición seguidos de Leete, utilizando valina-U-C^{14} han introducido consideraciones acordes con la hipótesis de que el ácido isodecanoico C_{10} se forma a partir del isobutiril-coenzima A y tres unidades de acetato (Trease, 1998).

2.13. Método de cuantificación para Capsaicina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos es una técnica analítica, mediante la cual separa los componentes de una mezcla a medida que son transportados por la fase móvil líquida a través de la fase estacionaria, mediante una serie de interacciones químicas entre el analito y la columna (Andrews & Abbot, 1992).

HPLC es una técnica de separación en la que se introduce una mezcla de muestra en una columna. Los diferentes compuestos de la mezcla pasan a través de la columna a diferentes velocidades, debido a las diferencias en su comportamiento de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria. Al final de la columna se separa la mezcla en sus componentes individuales y pueden ser detectados mediante un detector de UV-Vis para medir la absorción de las sustancias en una longitud de onda determinada. El valor de absorción es proporcional a la concentración del compuesto (Ley Beer-Lambert) (Andrews & Abbot, 1992).

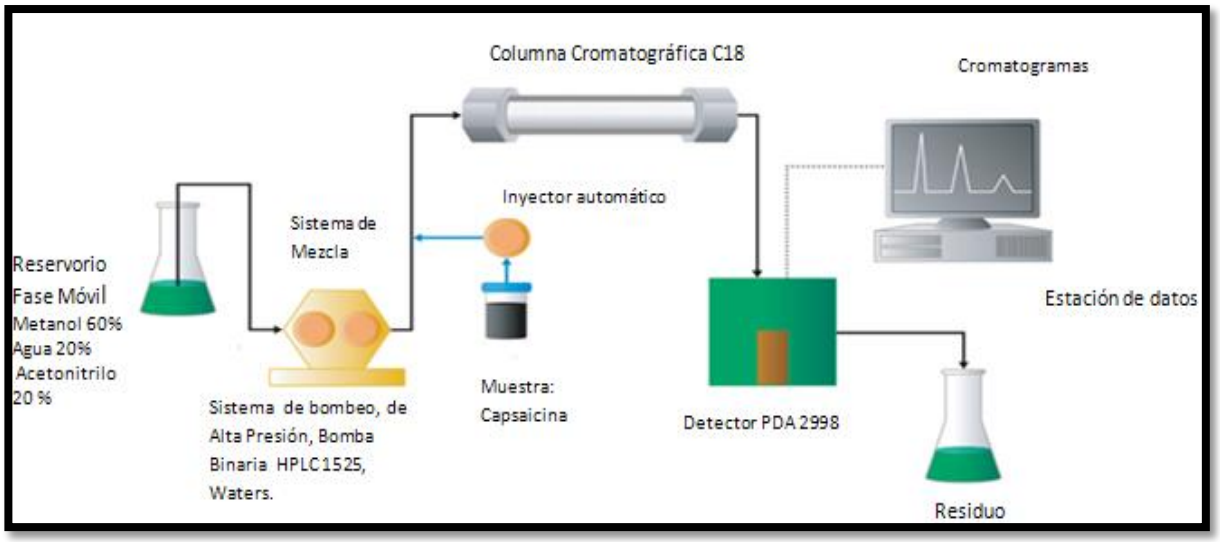
Figura 4. Esquema del proceso de análisis de Capsaicina mediante HPLC



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira.

Las razones de su importancia en el área de ciencias de la vida, investigación y desarrollo, análisis químico, clínica, medioambiental, alimentaria, forense, radica en su alta sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria. Ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

Figura 5. Componentes del Sistema HPLC



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

2.13.1. Instrumentación

Equipo Cromatográfico "*WATERS*" formado por:

- ✓ Bomba binaria Waters 1525 *System Controller*
- ✓ Inyector automático *WATERS*
- ✓ Columna WATERS Spherisorb 5µm ODS2
- ✓ *Photo diodo* Detector PDA 2998
- ✓ Software Empower serial # W1CAR8053M, *Chromatography Manager* de "*WATERS*"

2.13.2. Funcionamiento

2.13.2.1. Sistema de bombeo

En los equipos con alta tecnología, tienen la bomba de doble pistón *recíproco*, y en los últimos años la tendencia ha sido a simplificar mecánicamente las bombas, como consecuencia de las facilidades aportadas por la electrónica y los sistemas de control. La válvula de salida, provista de un muelle, mantiene constante la presión de salida, y un amortiguador reduce las oleadas de presión. La existencia del émbolo en este tipo de bombas, permite que el disolvente se introduzca a través de una válvula electrónica de entrada, sincronizada con el movimiento de un doble pistón recíproco, la cual está

diseñada para evitar que se forme burbujas de vapor de disolvente durante la embolada de entrada, así como también un flujo compuesto sin pulsaciones mediante la disposición alterna de ambos pistones en la bomba. La entrada y salida del disolvente en el cuerpo del émbolo se regula mediante las válvulas anti retorno, que permiten el paso del fluido en un solo sentido. De este modo, cuando uno de los émbolos, está impulsando líquido hacia el sistema, (columna) el otro se retrae y consecuentemente rellena su cámara correspondiente (Harris, 2007). El sistema de bombeo permite:

- ✓ Ser capaz de generar presiones del orden de las 6000 psi o 400 atm.
- ✓ Mantener un flujo reproducible de la fase móvil constante en el tiempo.
- ✓ Permitir la variación de dicho flujo en un intervalo práctico de trabajo (que puede ser de algunos microlitros por minuto hasta varios mililitros por minuto) en bombas de tipo analítico.
- ✓ Limitar los volúmenes muertos al máximo.
- ✓ Limitar las pulsaciones de presión inherentes al propio funcionamiento o amortiguarlas de manera eficaz.

2.12.2.1. Sistema de Inyección de la Muestra

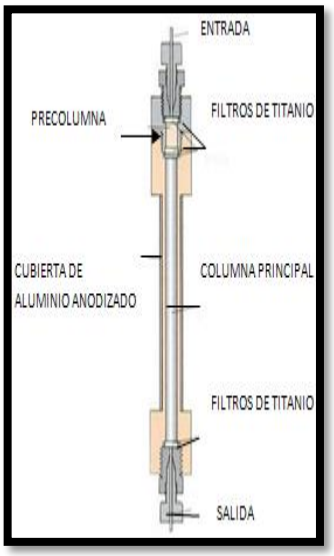
Consiste en un sistema de doble circuito, uno de los cuales éste conectado al exterior y el otro al propio sistema. El sistema de inyección debe permitir: la inserción de volúmenes fijos o variables de muestra en el sistema, sin romper o perturbar significativamente las condiciones de presión del mismo (Harris, 2007).

La mayor parte de los cromatógrafos actuales tienen inyectores, poseen especificaciones ópticas y robóticas, dichas unidades tienen la capacidad de inyectar muestras en el cromatógrafo de líquidos, a partir de frascos o viales que están en un carrusel o desde placas micro tituladoras. Contienen lazos de muestreo, y una bomba de jeringa, para inyectar volúmenes menores de 1 µl, hasta más de 1 mL (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

2.12.2.4. Columnas

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme**.**

Figura 6. Esquema de la columna cromatográfica



Fuente: (Harris, 2007)

Columnas analíticas

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 μm (Harris, 2007).

Precolumnas

En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además, en cromatografía líquido-líquido, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

La eficacia de una columna empaquetada aumenta, al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria, siendo el tamaño típico de 3-10 μm. La razón por la cual, las partículas pequeñas dan mayor resolución, es que permiten un flujo mucho más uniforme a través de la columna, y cuando más pequeñas son las partículas, mayor es el número de platos teóricos. Al disminuir el tamaño de la partícula: aumenta el número de platos, aumenta la presión y disminuye el tiempo óptimo de elución (Harris, 2007).

Tipos de rellenos de la columna

En cromatografía de líquidos se han utilizado dos tipos básicos de rellenos: pelicular y de partícula porosa. El primero consiste en bolas de vidrio o de polímero, no porosas y esféricas con unos diámetros característicos de 30 a 40 μm. En la superficie de estas bolas se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina o de una resina de intercambio iónico. Para algunas aplicaciones se aplica un recubrimiento adicional, constituido por una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción. Las bolas también se pueden tratar químicamente para obtener una capa superficial orgánica. Por lo general, los rellenos peliculares se utilizan ampliamente en las precolumnas y no en las columnas analíticas (Andrews & Abbot, 1992).

Los típicos rellenos de partículas porosas de cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm y con la menor dispersión posible para un tamaño determinado. Las partículas son de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material más común. Las partículas de sílice se sintetizan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores al micrón en unas condiciones tales que se forman partículas mayores con diámetros muy uniformes. Las partículas que resultan se recubren muchas veces con películas orgánicas, que se unen química o físicamente a la superficie (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

2.12.2.5. Termostatos

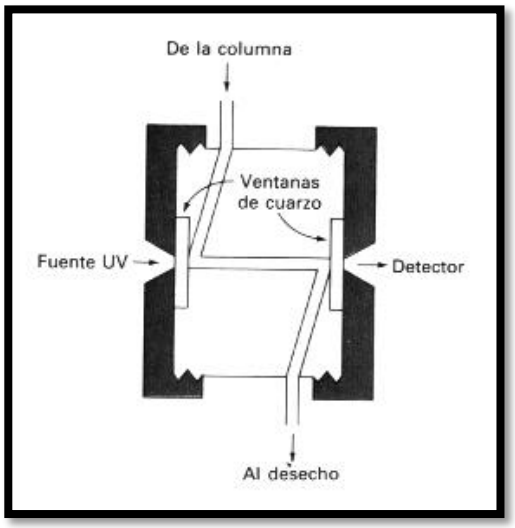
En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la temperatura de la columna en unas pocas décimas de grado centígrado, se obtienen mejores cromatogramas. La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente

hornos para las columnas que controlan la temperatura de la columna a las décimas de grado, desde la temperatura ambiente hasta 150 ºC (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

2.12.2.6. Detector

El papel del detector es proporcionar información sobre la presencia de las especies separadas en la columna cromatográfica (Detector UV, de fila de fotodiodos para HPLC).

Figura 7. Celda de absorción de radiación UV visible para HPLC



Fuente: (Harris, 2007)

Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Lo más común en estos casos es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm empleando otros filtros. Resulta obvio que este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda. Algunos grupos funcionales orgánicos y diversas especies inorgánicas exhiben una banda ancha de absorción a una o más de esas longitudes de onda (Harris, 2007).

2.13. Métodos de separación

2.13.1. Fase reversa

La cromatografía en fase inversa, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y la fase móvil es más polar. *Un disolvente menos polar tiene mayor fuerza eluyente* (Harris, 2007). Los picos en cromatografía en fase inversa no presentan colas, porque la fase estacionaria tiene pocos puntos que adsorban con tanta fuerza a algún soluto, originando colas, además este tipo de cromatografía es menos sensible a impurezas polares (como el agua) que puede haber en el eluyente (Andrews & Abbot, 1992)

Cuadro 11. Tipos de separación de la mezcla

MODO DE SEPARACIÓN	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL
Fase Normal	Polar	No Polar
Fase Reversa	No polar	Polar

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Las fases móviles más utilizadas en fase reversa son mezclas de agua y un disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo, o tetrahidrofurano, normalmente) (Harris, 2007).

2.13.2. Modos de elución en HPLC

El soporte que se utiliza son partículas microporosas esféricas de sílice, muy puras que son permeables al disolvente, que tiene un área superficial de varios centenares de metros cuadrados, que se puede disolver a un pH de 8 (Andrews & Abbot, 1992).

2.13.2.1. Elución isocrática

Se lleva a cabo con un solo disolvente (o una mezcla de composición fija) (Andrews & Abbot, 1992).

Elección del disolvente

El tipo de disolvente, se escoge de acuerdo al criterio del investigador en relación a la selección del modo de separación de la mezcla. Estando ubicada en el cuadro No.9. El

Metanol con una fuerza eluyente máxima de 0.70 es el disolvente orgánico más polar (Skoog, Holler, & Stanley, 2008).

Cuadro 12. Fuerza eluyente de los principales disolventes orgánicos utilizados en Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia

SERIE ELUOTRÓPICA Y LONGITUDES DE ONDA UV. EN CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN		
Disolvente	Fuerza Eluyente €°	Corte en el Ultravioleta (nm)
Pentano	0.00	190
Hexano	0.01	195
Heptano	0.01	200
Tricloroflurometano	0.02	231
Tolueno	0.22	284
Cloroformo	0.26	245
Diclorometano	0.30	233
Éter dietílico	0.43	215
Acetato de etilo	0.48	256
Éter metil T-butílico	0.48	210
Dioxano	0.51	215
Acetonitrilo	0.52	190
Acetona	0.53	330
Tetrahidrofurano	0.53	212
2- Propanol	0.60	205
Metanol	0.70	205

Fuente: (Snyder, 1990)

Las moléculas del disolvente y las moléculas del soluto, compiten entre sí para reaccionar con los puntos activos de la fase estacionaria. Cuanto mayor sea la fuerza eluyente del disolvente, más fácilmente se desplaza el soluto (Harris, 2007).

2.14. Selección del modo de separación de la mezcla

Según Harris (2007), existen varios modos de separar los compuestos de una mezcla. En el caso de la cromatografía en fase inversa, es normalmente adecuada para separar mezclas orgánicas neutras o cargados, de bajo peso molecular<2000g/mol.

2.15. Método para determinación analítica de estándar externo

Constituye la base fundamental de numerosas determinaciones analíticas. Permite calcular el contenido, por ejemplo de concentraciones o porcentaje de masa, de uno o de varios constituyentes que aparecen en los cromatogramas. Se sigue el siguiente esquema propuesto por Andrews & Abbot (1992):

1. Disolución patrón del compuesto que va a ser determinado, como Concentración de referencia (C ref.).
2. Se inyecta un volumen V de la disolución del estándar de referencia y se mide el área de referencia (A ref.). del pico correspondiente en el cromatograma.
3. A continuación, sin cambiar ninguna de las condiciones de análisis, se inyecta un volumen idéntico V de las diferentes muestras a analizar, conteniendo el compuesto a ser medido (Cmstra) y siendo el área del pico de elución (Amstra) correspondiente.
4. Comparación de los cromatogramas obtenidos

CAPÍTULO III.

MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS

3.1. Localización geográfica de las especies de *Capsicum* recolectadas.

Las especies que se utilizaron en la presente investigación fueron recolectadas durante los meses de Julio a Septiembre del 2012. La muestra de cada una de las especies fue de aproximadamente 1 kilo de fruto maduro, utilizando la técnica del muestreo aleatorio estratificado, en plantaciones de diversas regiones del país, sitios que se detallan a continuación:

- ***C. baccatum***, sus frutos fueron recolectados de una plantación familiar ubicada en el Km 19 vía a Quevedo, Recinto Mirador del Baba, provincia de Los Ríos, con una temperatura media de 25°C, humedad relativa 85,84%, con precipitaciones anuales de 2223,85 mm y a una altura de 370 msnm, cuyas coordenadas fueron 01°02'00”S, 79°27'00”W.
- ***C. chinense,*** sus frutos fueron recolectados de una chacra de consumo interno de una comunidad Tsáchila ubicada en el Km 16 vía a Chone, en la parroquia San Jacinto del Búa, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, con una temperatura media de 28°C, humedad relativa 75%, con precipitaciones anuales de 3150 mm y a una altura de 320 msnm, cuyas coordenadas fueron 0°25'39”S, 79°17'42”W.
- ***C. pubescens***, sus frutos fueron recolectados de una plantación comercial ubicada en el Km 6 vía a Cariamanga, cantón Gonzanamá de la provincia de Loja con una temperatura media de 15°C, humedad relativa 79%, con precipitaciones anuales de 970 mm y a una altura de 2400 msnm, cuyas coordenadas fueron 03°59'35”S, 79°12'15”W
- ***C. annuum***, sus frutos fueron recolectados de una plantación comercial ubicada en el Km 3 vía a Esmeralda, cantón San Lorenzo de la provincia de Esmeraldas con una temperatura media de 28°C, humedad relativa 82%, con precipitaciones anuales de 4000 mm y a una altura de 20 msnm, cuyas coordenadas fueron 01°17'18”S, 78°50'13”W

- ***C. frutescens,*** sus frutos fueron recolectados de una plantación familiar ubicada en el cantón Gualaquiza, provincia de Morona Santiago con una temperatura media de 26°C, humedad relativa 83%, con precipitaciones anuales de 3000 mm y a una altura de 600 msnm, cuyas coordenadas fueron 02°02'10”S, 78°13'30”W

Cuadro 13. Sitios de recolección de las especies seleccionadas para la extracción de Capsaicina

Fecha de Recolección	Nombre común	Nombre Científico	Localidad	Ubicación Geográfica
12/08/2012	Ají Cereza	*Capsicum baccatum*	Km 19 vía a Quevedo, Recinto Mirador del Baba, Los Ríos	01°02'00”S, 79°27'00”W, Alt.: 370 msnm
25/08/2012	Ají Habanero	*Capsicum chinense*	Km 16 vía a Chone, parroquia San Jacinto del Búa, Santo Domingo de los Tsáchilas	0°25'39”S, 79°17'42”W, Alt.: 320 msnm
24/09/2012	Ají Rocoto	*Capsicum pubescens*	Km 6 vía a Cariamanga, cantón Gonzanamá, Loja	03°59'35”S, 79°12'15”W, Alt.: 2200 msnm
17/08/2012	Ají Ratón	*Capsicum annuum*	Km 3 vía a Esmeralda, cantón San Lorenzo, Esmeraldas	01°17'18”S, 78°50'13”W, Alt.: 20 msnm
25/09/2012	Ají Gallinazo, Tabasco	*Capsicum frutenscens*	Gualaquiza, Morona Santiago	02°02'10”S, 78°13'30”W, Alt.: 514 msnm

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

3.2. Recolección del material vegetal

La recolección para cada muestra botánica se realizó, de manera sistemática y ordenada, llevando las respectivas anotaciones en la libreta de campo (véase Anexo 2).

1. Se efectuó un corte con las tijeras para podar en la porción terminal de una rama, aproximadamente 30-40 cm, procurando que contenga frutos en estado maduro.
2. Se colocó en fundas plásticas estériles, con su respectivo código de identificación sin cerrarlas. En el caso de muestras botánicas difíciles de recolectar como es el *Capsicum pubescens*, por su tamaño se dividió en tres partes a la planta para colectar, las, flores, el tallo, y el fruto por separado.
3. Se recolectó cada espécimen de acuerdo a los caracteres morfológicos de interés para nuestra investigación como son flores, hojas, tallos y frutos.

4. En el caso de los frutos se recogió aproximadamente 1 kg en estado maduro, que además de ayudarnos a la identificación botánica, se utilizó para la extracción del alcaloide.
5. Se situó los frutos, en fundas plásticas estériles y se roció con alcohol al 70% sin cerrarlas.
6. Inmediatamente después de la realización del trabajo de campo y recolección de muestras desde los diferentes lugares de origen, se tomó hojas de papel periódico dobladas por la mitad con su respectiva codificación, y se colocó cada espécimen vegetal dentro, armando bloques sin que sobresalga el material vegetal. Se cerraron los papeles haciendo suficiente presión al paquete y se amarró en cruz para su posterior transporte.

La valoración de la droga se realizó en la Universidad Politécnica Salesiana en el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), en el laboratorio de Análisis Químico.

3.3. Control de identidad

La identificación de la droga se realizó comparando una muestra representativa de la droga problema (frutos) con un espécimen auténtico y certificado del Herbario, corroborando con la información suministrada por la literatura científica que describe las características propias de cada especie.

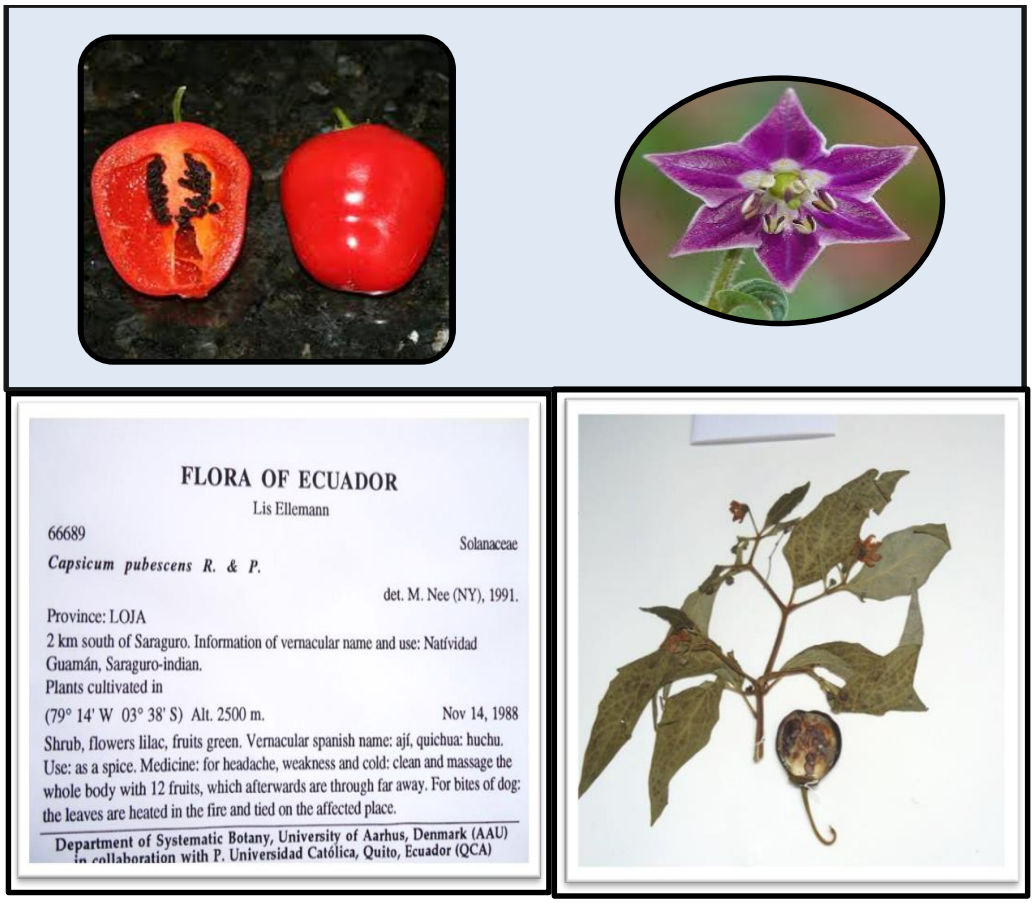
Dicha comparación se realizó en el Herbario Nacional del Ecuador bajo la dirección y colaboración de la Dra. Diana Fernández en el mes de Octubre del 2012. El certificado que corrobora dicha información se encuentra en el Anexo 3.

3.3.1. Rocoto (*Capsicum pubescens*)

Sus flores de color púrpura y blanco, con hojas dentadas y sus semillas negras y arrugadas hacen que esta especie sea fácil de reconocer. Esta produce frutos tan grandes como una campana de ají, pero en lugar de ser un sabor suave, estos son muy picantes con cierto sabor acre. Sus tonos son tan variados y llamativos que van desde rojo brillante, anaranjado, amarillo o marrón, con diferentes formas y tamaños.

Esta planta es una de las que más tolera el frío. Estas crecen a alturas mucho más elevadas que otras especies, generalmente desde 1500 a 2.900m, pero no pueden tolerar el calor característico de las tierras bajas (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003)

Figura 8. Comparación de las muestras recolectados con el especímenes de *C. pubescens* encontrado en el Herbario Nacional de Quito



3.3.2. Tabasco (*Capsicum frutescens*)

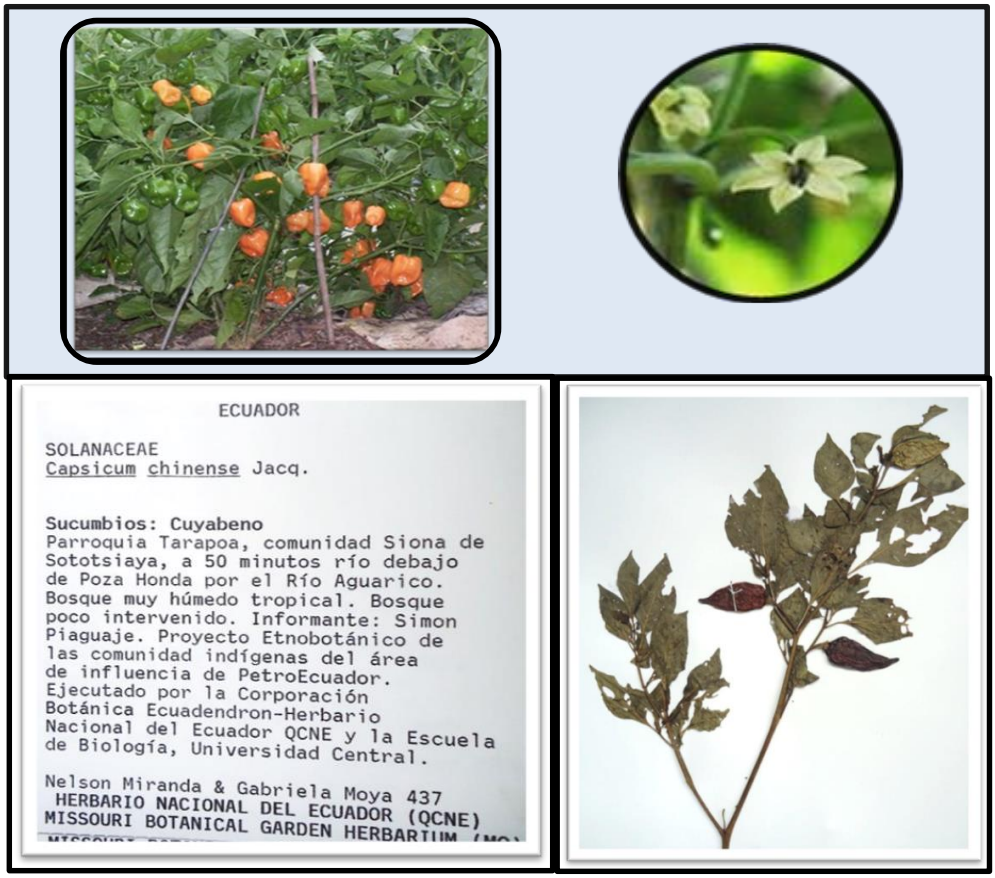
Flores solitarias en cada nudo (ocasionalmente fasciculadas). Pedicelos erectos en la antesis, pero flores tumbadas. Corola blanca verdosa, sin manchas difusas en la base de los pétalos con frecuencia ligeramente revolutos. Cáliz de los frutos maduros sin constricción anular en la unión con el pedicelo, aunque a menudo irregularmente rugoso; venas usualmente no prolongadas en dientes. Carne del fruto a menudo blanda. Semillas color blancas. Numero cromosómico 2n=24, con un par de cromosomas acrocéntricos (Heiser, 1964).

Figura 9. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. frutescens* encontrado en el Herbario Nacional de Quito

3.3.3. Habanero (*Capsicum chinense*)

Dos o más flores en cada nudo (ocasionalmente solitarias). Pedicelos erectos o pendientes en la antesis. Corola blanca verdosa, sin manchas difusas en la base de los pétalos; pétalos de la corola usualmente rectos. Cáliz de los frutos maduros usualmente con constricción anular en la unión con el pedicelo, venas no prolongadas en dientes. Carne del fruto firme, semillas color blancas. Número cromosómico 2n=24, con un par de cromosomas acrocénticos (Heiser, 1964).

Figura 10. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. chinense* encontrado en el Herbario Nacional de Quito



3.3.4. Ají cereza (*Capsicum baccatum*)

Flores solitarias en cada nudo. Pedicelos erectos pendientes en la antesis. Corola blanca, con manchas amarillas en la base de los pétalos de la corola; pétalos de la corola ligeramente revolutos. Cáliz de los frutos maduros sin constricción anular en la unión con el pedicelo. Frutos redondos de no más de 2 cm de largo con forma de cereza de color rojo brillante. Carne del fruto firme. Semillas color blanca (León, 2000).

Figura 11. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. baccatum* encontrado en el Herbario Nacional de Quito

3.3.5. Ají ratón (*Capsicum annuum)*

Planta anual de 0,5 a 1 metro de alto, hojas pecioladas, enteras aovadas, corola blanca con pétalos rectos. Flores solitarias en cada nudo (ocasionalmente fasciculadas) pedicelos generalmente declinados en la antesis. Corola blanca lechosa; corola con lóbulos usualmente erectos. El cáliz del fruto maduro sin constricción anular en la unión con el pedicelo aunque a veces irregularmente rugoso, venas a menudo prolongadas en dientes cortos. Fruto maduro parcialmente firme, es extremadamente variable en tamaño, forma y color, además del grado de pungencia (Heiser, 1964).

La principal característica de esta especie son los pedicelos fructíferos erectos, frutos rojos alargados de no más de 3 cm. de largo.

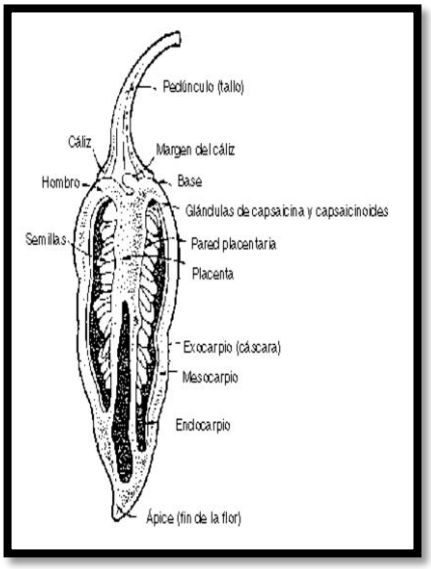
Figura 12. Comparación de las muestras recolectados con el espécimen de *C. annuum* encontrado en el Herbario Nacional de Quito

3.4. Evaluación macroscópica de las drogas

La evaluación macroscópica de la droga cruda se realizó el 22 de Octubre del 2012 en el CIVABI en el laboratorio de análisis químico en función a la clasificación morfológica , flores, frutos, hojas y semillas, los mismos que se tomaron con mayor énfasis en los frutos de las cinco especies analizadas, que al comparar con bibliografía científica la parte que constituye la droga y donde es producida la capsaicina es en las glándulas que se encuentran en el punto de unión de la placenta y la pared del pericarpio que se

extiende de modo no uniforme a través del interior del fruto y se concentra mayormente en el tejido placentario y en el pericarpio (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

Figura 13. Estructura interna de los frutos de *Capsicum*



Fuente: (Garcia-Barriga, 1992)

Se efectuó un registro de las características relevantes del fruto, tanto de la forma, textura, color, tamaño así como los caracteres organolépticos de aroma y sabor que brinda características propias de cada especie.

1. Para tener un conocimiento completo de la biología de las especies analizadas, se examinó todas las características fenotípicas de las flores, que dan un conocimiento en el aspecto reproductivo.

3.5. Estudio químico cualitativo

3.5.1. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó tomando en cuenta el procedimiento establecido en el manual de Análisis de drogas y extractos de la Dra. Migdalia Miranda (2002), mediante la extracción sucesiva de la droga vegetal para la aplicación de análisis y poder establecer los principales grupos de constituyentes químicos presentes en las diferentes especies de *Capsicum*, y a partir de allí orientar la extracción de los extractos para el aislamiento de los alcaloides presentes en las mismas.

3.5.1.1. Metodología

1. Se pesó 30 gramos de la droga vegetal (fruto seco) y se extrajo con 90 ml de éter etílico mediante maceración durante 48 h a temperatura ambiente.
2. Se procedió a filtrar en vasos de precipitación y el extracto se concentró a sequedad.

Cuadro 14. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto etéreo

METABOLITO ENSAYADO	REACTIVO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Aceites y grasas	**Sudan:** se le añade 1 ml de una solución diluida en agua del colorante. Se calienta hasta evaporación.	Positivo: Presencia de gotas o película coloreada de rojo en el líquido.
Alcaloides	**Dragendorff:** redisolver en 1 ml de HCL 1% en agua. Añadir 3 gotas de reactivo	Positivo: Opalecia (+) Turbidez definida (++) Precipitado (+++)
Lactonas y Coumarinas	**Baljet:** redisolver con 1 ml de alcohol. Adicionar 1 ml del reactivo	Positivo: Coloración roja (+) Precipitado rojo (++)
Triterpenos esteroides	**Liebermann-Burchard:** redisolver en 1 mL de cloroformo. Se le adiciona 1 mL de anhídrido acético, mezclar bien, por la pared del tubo de ensayo dejar resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.|	Positivo: Cambio de coloración desde purpura a verde oscuro.

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

3. El residuo del proceso anterior se extrajo con etanol al 96% tres veces su volumen en peso, es decir que en nuestro caso fue 29 g de residuos y en el volumen fue de 87 ml. Se colocó en maceración durante 48 h y a temperatura ambiente.
4. Se filtró y se obtuvo el extracto etanólico para realizar los ensayos correspondientes.

Cuadro 15. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto etanólico

METABOLITO ENSAYADO	REACTIVO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Catequinas	Tomar una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de calcio.	Positivo: Mancha verde a la luz UV (+++)
Resinas	Adicionar a 2 mL del extracto alcohólico 10 mL de agua destilada.	Positivo: Precipitado (+++)
Alcaloides	**Dragendorff:** en 1 mL de extracto añadir 1 ml de HCL 1% en agua. Agregar 3 gotas de reactivo. **Mayer.** En 1 mL de extracto añadir 1 ml de HCL 1% en agua. Agregar 3 gotas de reactivo	Positivo Precipitado (+++) Positivo Precipitado (+++)
Azucares reductores	Evaporar la alícuota y el residuo redisolver en 1-2 mL de agua. Se le adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua de 5-10 minutos	Positivo: Coloración roja (++) Precipitado rojo (+++)
Saponinas	Diluir la alícuota cinco veces su volumen en agua y se agita la muestra fuertemente de 5-10 minutos.	Positivo: Espuma en la superficie de más de 2 mm de altura y persistente por más de dos minutos (+++)
Compuestos fenólicos y taninos	**Cloruro Férrico:** A una alícuota de 2 mL del extracto se le adicionan 3 gotas de Tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.	Positivo: • Coloración rojo-vino: compuestos fenólicos en general • Coloración verde intensa: taninos del tipo pirocatecólicos • Coloración azul: taninos del tipo pirogalotánicos.
Aminoácidos libres o aminas en general	**Ninhidrina:** Mezclar la alícuota con 2 mL con solución al 2% de Ninhidrina en agua. Calentar de 5-10 minutos en baño de agua.	Positivo: Coloración azul violáceo (+++)
Flavonoides	**Shinoda:** Diluir la alícuota de 2 mL del extracto con 1 Ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción esperar 5 minutos y añadir 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.	Positivo: Si el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo, intenso en todos los casos (+++)

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

5. Finalmente se realizó el mismo procedimiento para el screenig del extracto acuoso.
6. Se extrajo con tres veces el peso del residuo en volumen con agua por maceración durante 48 h.
7. Se filtró obteniéndose el extracto acuoso.

Cuadro 16. Procedimiento para ensayo de metabolitos en extracto acuoso

METABOLITO ENSAYADO	REACTIVO/PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Azucares reductores	**Fehling:** adicionar 2 ml del reactivo, se calienta de 5-10 minutos la mezcla	Positivo: Coloración o precipitado rojo
Principios amargos y astringentes	Saborear una gota del extracto	Positivo: reconocer el sabor de cada uno de los principios diferenciados al paladar
Alcaloides	**Dragendorff:** redisolver en 1 ml de HCL 1% en agua. Añadir 3 gotas de reactivo **Mayer: en** 1 mL de extracto añadir 1 ml de HCL 1% en agua. Agregar 3 gotas de reactivo	Positivo: Opalecia (+) Turbidez definida (++) Precipitado (+++)
Mucilagos	Una alícuota del extracto se enfría de 0-5°C	Positivo: Consistencia gelatinosa

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

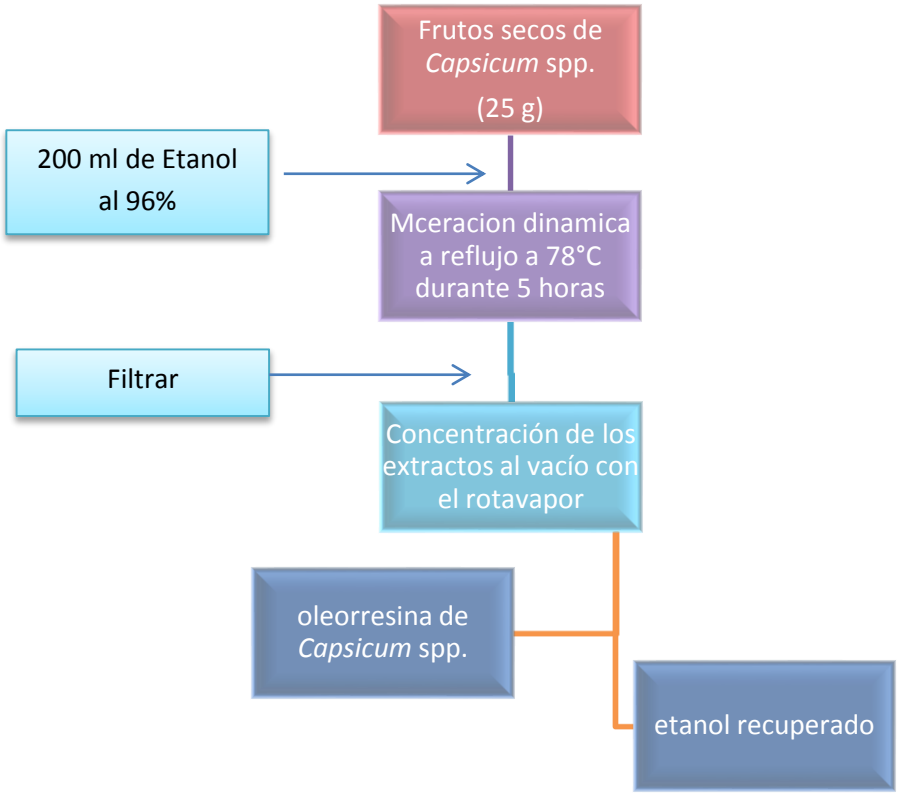
3.6. Extracción de la oleorresina

Dentro del procedimiento realizado en el laboratorio de Química analítica del CIVABI, para la obtención de la oleorresina de las cinco especies vegetales de *Capsicum*, se coloca la materia prima seca, previamente sometida al proceso de control de calidad, en el equipo de destilación básico y mediante maceración dinámica a reflujo con etanol durante 5 horas, tomando en cuenta el punto de ebullición del disolvente utilizado, a 78ºC, y agitación constante. A continuación se realizó la filtración del extracto obtenido, con papel filtro.

Se concentró en un factor de 10 a los extractos obtenidos en el proceso anterior con el equipo “Rotavapor” para obtener la oleorresina correspondiente.

Para cada especie vegetal se realizaron tres repeticiones para la obtención de la oleorresina, haciendo un total de 15 muestras o unidades experimentales. Esta oleorresina no debe de llegar a sequedad, es decir debe de tener una consistencia cremosa.

Figura 14. Procedimiento de extracción de la oleorresina de *Capsicum* spp**.**



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

3.6. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es un método de separación sencilla de sustancias químicas. Puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferencia de velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento (Andrews & Abbot, 1992).

3.6.1. Identificación de la Capsaicina de las oleorresinas por TLC

3.6.1.1. Preparación de las muestras

Se realizó la preparación de las cinco muestras antes de Inyectar en el Equipo LINOMAT 5 para cromatografía TLC

1. Se trabajó con 50 mg de oleorresina, la cual se pesó en la balanza analítica Shimadzu y se disolvió en 1 mililitro de metanol según la documentación científica consultada (Sein, Gardinali, Mandrile, & Cafferata, 1998).
2. Dicha disolución de oleorresina se realizó para cada especie representativa analizada.

3.6.1.2. Preparación del estándar y las muestras

El estándar de Capsaicina USP (98,9% de pureza) (véase Anexo 4) se preparó a una concentración de 2,5 mg/ml de metanol.

Figura 15. Disoluciones de oleorresina de *Capsicum* para análisis mediante TLC.

Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

3.6.1.3. Manejo del software *WINCATS* para *Linomat 5*

EL equipo *Linomat 5* actúa en combinación con los instrumentos controlados del software WINCATS. Los requerimientos utilizados en cada análisis llevan a cabo de manera automática a través del software que permite controlar, monitorear y documentar todos los pasos de la cromatografía en capa fina (TLC).

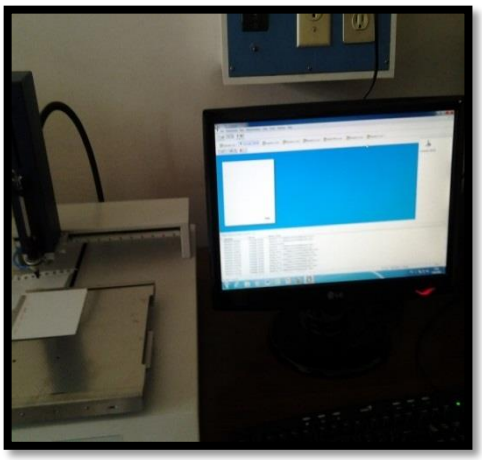
1. Se realizó la programación del software WINCATS en función del tamaño de la placa de sílica Gel de 10*10 (fase estacionaria), con su orientación en el eje de las ordenadas.
2. Se coloca la placa y se ajusta al equipo de soporte.

3.6.1.3. Aplicación de las muestras

El equipo Linomat 5, posee aplicador de muestra en bandas por espray sobre placas TLC, esto ayudó a optimizar el tiempo en comparación con la aplicación directa con capilares, debido a que mediante este dispositivo se inyecta la cantidad exacta de microlitros. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

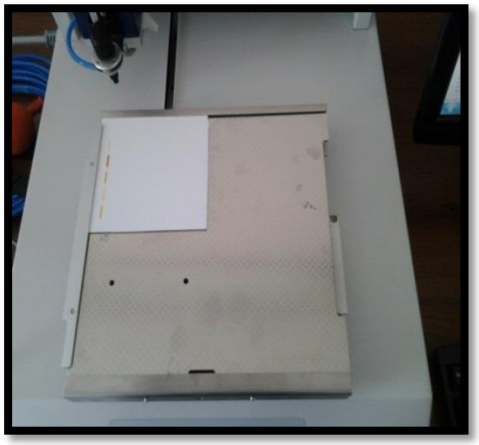
1. Las muestras de las solución de oleorresina se homogenizó con agitación durante 5 minutos.
2. Se cargó en la jeringa de dosificación de 100 µL alrededor de 30 µL, evitando la formación de burbujas en el interior. Luego de lo cual se colocó en el aplicador del equipo.
3. Se cargó el método para el TLC de la capsaicina en el programa WINCATS (Linomat 5), determinando los requerimientos para la fase estacionaria. El disolvente utilizado fue metanol. La cantidad exacta de inyección en microlitros y el número de bandas a muestrear se resume en el Cuadro 17

Figura 16. Equipo *Linomat 5* inyectando las muestras de oleorresina de *Capsicum*



Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Figura 17. Placa cromatográfica con las muestras de oleorresina de *Capsicum*



Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 17. Posición de la aplicación del recorrido de las muestras para TLC

POSICIÓN DEL RECORRIDO DE LAS MUESTRAS			
Posición 1 (St.)	Estándar Capsaicina (98% pureza)	30 µL	15.0 mm
Posición 2 (M 1)	*Capsicum vácateme*	10 µL	29.0 mm
Posición 3 (M 2)	*Capsicum chinense*	10 µL	43.0 mm
Posición 4 (M 3)	*Capsicum pubescens*	10 µL	57.0 mm
Posición 5 (M 4)	*Capsicum annuum*	10 µL	71.0 mm
Posición 6 (M 5)	*Capsicum frutescens*	10 µL	85.0 mm

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

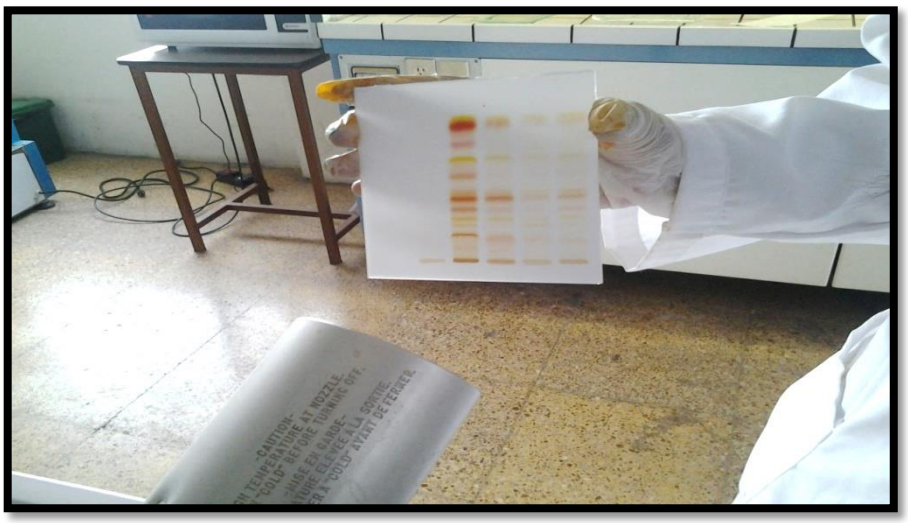
4. La placa se colocó verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente utilizado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. Se tomó como fase móvil al éter etílico y hexano (3:1) debido a su polaridad, ya que la Capsaicina al ser predominantemente no polar debe ser arrastrada por un disolvente de similares características.

Figura 18. Corrida de las muestras con la fase móvil en la placa cromatográfica

Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

5. El eluyente va a migrar por capilaridad en la placa cromatografía, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Se procedió a secar la placa cromatográfica con un secador, a temperatura baja para evitar la degradación de los principios activos.

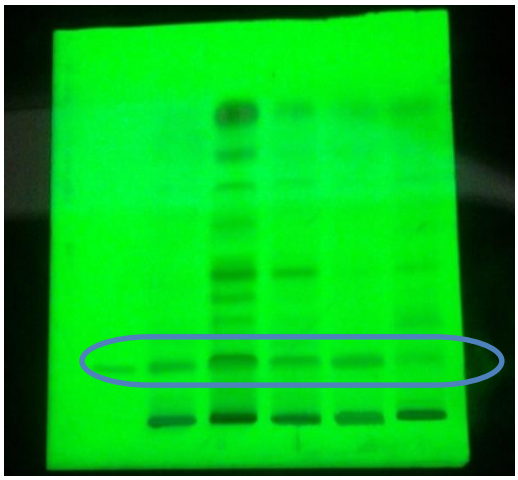
Figura 19. Evaporación del eluyente de la placa cromatográfica



Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

6. Se esperó a que se evapore el eluyente de la placa y se analizó utilizando luz UV a 254 nm en el *CAMAG*. Como muestra la Figura No. 20. Se observaron las manchas de capsaicina tanto del estándar como de las muestras analizadas, ya que estas presentan una leve florescencia a dicha longitud de onda por lo cual no fue necesario utilizar ninguna sustancia reveladora.

Figura 20. Bandas de Capsaicina en placa cromatográfica observada a 254 nm



Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

7. Finalmente al ser esta una prueba de análisis cualitativo se procedió a aplicar reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.

Figura 21. Placa cromatográfica observada a 352 nm

Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

3.7. Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC

3.7.1. Lineamientos para la utilización del HPLC

El análisis HPLC cuantitativo de las 15 muestras de oleorresina de *Capsicum* spp., se realizó en un cromatógrafo de alto rendimiento; marca *WATERS* con una bomba binaria 1525, un detector 2998 PDA Photodiodo UV/vis de longitud de onda programable y una columna C18 *Spherisorb* ODS2, 80A°, fase reversa 5µm, 4.6mm*150mm, 1pkg [PSS831913], Silanol. USP L1 para la fase estacionaria. El sistema HPLC está equipado un software *Empower*.

3.7.2. Desarrollo del método

Preparación de Solución Stock: Se pesaron 12.64 mg de estándar de Capsaicina USP≥98,9% HPLC en un balón de 25 ml y se llevó a aforo con Metanol grado HPLC. La solución resultante posee una concentración de 500 ppm.

Preparación de Estándares: A partir de la solución Stock se realizó las diluciones pertinentes para obtener soluciones más diluidas.

- Se tomaron 5 ml de la solución stock aforándose en un balón de 25 ml con metanol para la obtención de la concentración de 100 ppm.
- Se tomaron 4 ml de la solución stock aforándose en un balón de 50 ml para obtener una concentración de 40 ppm.
- Se realizó el mismo procedimiento para los otros estándares.

Cuadro 18. Preparación de los estándares de Capsaicina para análisis de HPLC

Menor a Mayor	SOLUCIÓN STOCK (mL)	VOLUMEN (mL)	CONCENTRACION DE CAPSAICINA (ppm)
Estándar 1	0.5	50	5
Estándar 2	1	50	10
Estándar 3	2	50	20
Estándar 4	4	50	40
Estándar 5	5	25	100
Estándar 6	25	25	500

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Curva de Calibración: Se inyectó patrones de concentración conocida, teniendo la finalidad de conocer los tiempos de retención exacta del alcaloide y calibración del equipo para la cuantificación de las concentraciones a través de estándar externo. Se inyectó 20 µL de cada uno de los estándares y se realizó la regresión lineal comparando la concentración de capsaicina y el área de pico obtenido en el cromatograma, teniendo así las referencias necesarias para las mediciones de las muestras posteriores.

Tratamiento previo de las muestras: Siguiendo la metodología establecida para cuantificación de capsaicina de la AOAC (1999) (véase Anexo 5) se pesó 200 mg de oleorresina en un matraz aforado de 10 ml. evitando que la oleorresina forme una capa a los costados del balón. Se añadió 1 ml de acetona y se agitó hasta que la porción de muestra este completamente dispersa. Se añadió 1 ml de etanol puro, agitando durante cada adición, finalmente se aforó con etanol hasta los 10 ml y se mezcló bien. Se calentó la muestra a baño maría a una temperatura menor a 60ºC, para evitar la degradación de la capsaicina.

Inyección de las muestras: Las muestras fueron colocadas en ultrasonido durante 15 min. Se toma una alicuota de 5 ml y se filtra con aerodisk de 0.45 µm de 1-4 ml de solución en un vial de vidrio.

Cuantificación: Las soluciones se envasaron y etiquetaron en viales de 2 ml, se colocaron en el automuestreador del equipo HPLC *Waters* que fue previamente cargado con la metodología para Capsaicina bajo las condiciones que indica el Cuadro 19. Una vez conocida el área del pico que se requiere cuantificar, es posible obtener la concentración, con la curva de calibración del estándar, ya que relaciona la respuesta del detector con la cantidad de compuesto inyectado, cuyos parámetros se determinaron con la bibliografía científica antes consultada Harris (2007) y Skoog, *et al* (2008).

Cuadro 19. Condiciones del HPLC para la cuantificación de Capsaicina

FASE ESTACIONARIA	Columna *Spherisorb* de acero Inoxidable C18 fase reversa,ODS2 de 4.6mm*150mm
FASE MÓVIL	Metanol 60%,Acetonitrilo 20% ,Agua 20% ,grado HPLC , elución isocrática
FLUJO	0.8 mL/min durante 5 min
LONGITUD DE HONDA	280 nm
TEMPERATURA DE LA COLUMNA	29 ºC
VOLUMEN DE INYECCIÓN	20 µL

Fuente: Agrociencia 2008

Esta metodología se realizó durante 5 días seguidos para poder hacer las repeticiones pertinentes por triplicado, bajo las mismas condiciones y obtener datos suficientes para el respectivo análisis estadístico.

3.8.Método Scoville

El método Scoville es actualmente conocido como un *Estándar Internacional* (ISO 3513 -1977) para la aplicación en extractos o productos de ají para evaluar el grado de pungencia (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003).

Se debe convertir a Unidades Scoville para determinar el grado de pungencia de las especies analizadas, para ello se considera que una parte por millón (1 ppm) de capsaicina equivale a 15 Unidades Scoville (US) (Batchelor 2000).

3.8.1. Determinación de unidades de pungencia Scoville (SHU)

Para determinar el Valor de Pungencia en Unidades Scoville (SHU) para cada una de las muestras, es necesario multiplicar la concentración de capsaicina presente (g/g) por el SHU del compuesto puro, al añadir éste valor se obtiene un valor total de SHU (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003). Se detalla a continuación:

1ppm capsaicina = 15 unidades Scoville= 1 ASTA

Se debe realizar una suma ponderada, resultando en unidades ASTA de “pungency” (vocablo inglés para algo acre, punzante, intenso). Estas unidades se han de multiplicar por 15 para encontrar su equivalente en SHU.

De manera adicional. El rango de unidades Scoville (SHU) aceptado internacionalmente para chiles frescos de buen grado, es de 2500 a 5000 SHU Utilizando la equivalencia sugerida por Vacas Cruz (2008) para convertir unidades Scoville en µg CAPS/g chile (1 µg CAPS/g chile fresco=15 SHU) se tiene que 2500 SHU equivalen a 0.1667 mg CAPS/g chile, mientras que 5000 SHU son equivalentes a 0.3333 mg CAPS/g chile.

3.9.Análisis de Cluster

Se planificó un diseño de campo para la toma de las muestras, lo cual ayudó de manera adecuada al registro y análisis de datos y posteriormente a la obtención de los resultados.

Se determinó como base cinco especies del género las cuales fueron recolectadas en diferentes provincias del Ecuador, de acuerdo a la bibliografía antes consultada en el Manual de Análisis de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogéneticos (2010).

Se estableció un muestreo aleatorio estratificado tomando como referencia 20 muestras vegetales para cada una de las de las especies nativas del género, con lo cual se recolectó dentro de un área específica en plantaciones productoras de ají.

Se registró 45 datos entre los descriptores cuantitativos como cualitativos de cada una de las muestras vegetales del género (véase Anexo 6).

Los datos cuantitativos de tipo continuo se midieron en unidades internacionales (SI) estándar y los datos cualitativos de tipo nominal o sin secuencia de los descriptores se registran usando una serie de estados previamente definidos.

La matriz básica de datos (MBD), se construyó a partir de la información que se obtuvo en la evaluación de las especies. Esta (MBD), es fundamental ya que constituye el punto de partida para la aplicación de las herramientas estadísticas como el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey.

Con el objetivo de poder saber la variabilidad del grupo y a su vez la estructura botánica se seleccionó descriptores muy específicos, y discriminatorios los cuales permitieron ahorrar tiempo al evitar la toma de datos repetitivos y con esto pudimos simplificar el análisis de resultados.

De los 45 descriptores se eligió 14 datos específicos los cuales fueron combinados con los datos del análisis químico de las especies vegetales antes estudiadas. Como se detalla en los siguientes cuadros:

Cuadro 20. Descriptores morfológicos cualitativos medidos en las plantas de *Capsicum* spp.

DESCRIPTORES MORFOLOGICOS CUALITATIVOS DE LAS ESPECIES DE *Capsicum*					
	C. baccatum	***C. chinense***	***C. pubescens***	***C. annuum***	***C. frutescens***
Color semillas[1]	1,00	2,00	3,00	1,00	2,00
Color fruto maduro[2]	8,00	5,00	7,00	6,00	8,00
Forma fruto[3]	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00
Aroma fruto[4]	2,00	4,00	3,00	3,00	4,00
Factibilidad de separación[5]	1,00	1,00	3,00	2,00	2,00
Firmeza del fruto[6]	2,00	2,00	3,00	1,00	1,00
Densidad del follaje[7]	1,00	2,00	2,00	2,00	1,05

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 21. Descriptores morfológicos cuantitativos medidos en las plantas de *Capsicum* sp.

DESCRIPTORES MORFOLOGICOS CUANTITATIVOS DE LAS ESPECIES DE *Capsicum*					
	C. baccatum	***C. chinense***	***C. pubescens***	***C. annuum***	***C. frutescens***
Altura planta (m.)	1,37	2,05	1,49	0,85	1,24
Longitud fruto (cm.)	1,24	4,65	4,07	2,17	2,71
Diámetro fruto (cm.)	1,79	3,10	3,40	0,61	0,76
Peso fruto (g.)	1,2	7,8	8,3	2,6	3,7

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

[1] 1=crema, 2=amarilla, 3=morada
[2] 1=amarillo-limón, 2=amarillo, 3=amarillo-naranja, 4=naranja-pálido, 5=naranja-rojo, 6=rojo claro, 7=rojo obscuro, 8=rojo brillante, 9=morado, 10=marrón.
[3] 1=elongado, 2=redondo, 3=triangular, 4=acampanado, 5=acorazonado, 6=cónico
[4] 1=sin aroma, 2=aroma suave, 3=aroma fuerte, 4=aroma fuerte acre
[5] 1=fácil, 2=medio, 3=difícil
[6] 1=suave, 2=intermedio, 3=duro
[7] 1=densa, 2=semidensa, 3=rala

Cuadro 22. Parámetros de control de calidad y cuantificación de Capsaicina en *Capsicum* spp.

PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD Y CUANTIFICACION DE CAPSAICINA					
	C. baccatum	***C. chinense***	***C. pubescens***	***C. annuum***	***C. frutescens***
Materias extrañas (%)	4,10	3,25	4,90	1,65	2,40
Humedad (%)	7,55	7,90	13,99	7,40	6,55
Cenizas totales (%)	4,99	3,62	3,53	4,66	4,14
Cenizas solubles en agua (%)	1,83	1,20	1,39	0,68	1,33
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico (%)	0,93	0,38	0,56	0,55	0,58
Rendimiento de oleorresina (%)	5,60	16,50	14,90	11,30	12,10
Densidad oleorresina (mg/ml)	0,75	0,79	0,84	0,94	0,71
pH oleorresinas	9,05	8,28	9,41	7,80	8,59
Concentración Capsaicina (mg/kg)	1164,69	11339,94	600,27	2992,01	2046,66

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Recolección del material vegetal

El siguiente mapa muestra la ubicación de los sitios de recolección de las especies de *Capsicum* utilizadas en la presente investigación. Las características como temperatura promedio y precipitaciones son factores importantes, ya que estos pueden modificar el contenido de Capsaicina en las muestras analizadas. Por lo cual es indispensable poseer información clara de las condiciones del cultivo de los mismos.

Figura 22. Mapa del Ecuador y ubicación de los sitios de recolección de las especies de *Capsicum*

Fuente: adaptado de http://maps.google.com

4.2. Control de identidad

Se realizó la identificación taxonómica en el Herbario Nacional de la ciudad de Quito, utilizando las partes aéreas de las muestras de *Capsicum* objetos de la investigación, de acuerdo a los certificados incluidos en el Anexo 3.

Dentro de los descriptores morfológicos del fruto se analizó las semillas de las cinco especies de *Capsicum* estudiadas y pudimos observar que todos y cada uno de los frutos presentaban semillas de color amarillo claro exceptuando la especie de *Capsicum pubescens*, (ají rocoto) el cual presentó semillas de color morado obscuro, lo cual se puede reafirmar con la literatura existente.

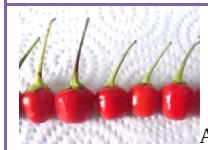
Según las características cualitativas de las especies, aunque comparten rasgos comunes presentan características propias, entre las cuales se puede destacar en *C. baccatum* la mancha en la corola; en *C. chinense* la constricción anular en el cáliz; en *C. frutescens* la posición erecta de los frutos y la posición pendiente de los frutos en *C. annuum* lo cual permitió identificar de manera clara a cada una de las muestras.

Cuadro 23. Análisis macroscópico de los frutos de las especies de *Capsicum* estudiadas

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA										
Características Cualitativas										
GRÁFICA	**Especies Nombre Científico**	**Color del fruto maduro**	**Forma de la base del fruto**	**Forma del ápice del fruto**	**Forma del fruto corte transversal**	**Forma del fruto corte longitudinal**	**Aroma**	**Textura**	**Uniformidad del fruto**	**Color de la semilla**
	Ají Cerezo *Capsicum baccatum* DBLR1	NARANJA-ROJO	Redondo obtuso	Acuminada	Redonda	Elíptica	Suave	Lisa	uniforme	Anaranjada
	Ají Habanero *Capsicum chinense* DBLR 2	ROJO CLARO	Truncado	Aguda	Lobada	Lanceolada	Dulce	Semi rugosa	Uniforme	Blanquecina
	Ají Rocoto Capsicum pubescens DBLR 3	ROJO OBSCURO VINO	Prolongado	Redondo	Lobada	Elíptica	Sin aroma	Lisa	No uniforme	Negra
	Ají Ratón *Capsicum annuum DBLR 4*	NARANJA-ROJO	Truncado	Aguda	Redonda	Elíptica alargada	Fuerte	Lisa	No uniforme	Blanquecina verdosa
	gallinazo, tabasco *Capsicum frutescens DBLR 5*	**NARANJA CLARO**	Prolongado	Aguda	Lobada suave	Ovado	Suave	Lisa	Uniforme	Amarilla

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 24. Análisis del contenido de materias extrañas en las especies de *Capsicum* estudiadas

MATERIAS EXTRAÑAS									
Especies	**Especies de *CAPSICUM***	**Partes de la droga que no corresponden a las especies**	**Partes de otras plantas**	**Mezclas de Minerales polvo ,piedra etc.**			**Peso inicial de la droga**	**Peso materia extraña**	P= X*100/M X= peso de materia extraña M= Peso inicial de la droga
Nombre común	Código	Pelos, excretas	Hojas, tallos, flores	Polvo	Arena	Piedras	g	g	**%**
 Ají cereza	DBLR 1 *Capsicum baccatum*	**X**	**X**	✓	✓	**X**	20	0,41	2,05
Ají Habanero	DBLR2 *Capsicum chínense*	**X**	**X**	✓	✓	**X**	20	0,35	1,75
Ají rocoto	DBLR3 *Capsicum pubescens*	✓	✓	✓	✓	**X**	20	0,38	1,90
Ají Ratón	DBLR 4 *Capsicum annuum*	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	20	0,33	1,65
Ají Gallinazo	DBLR5 *Capsicum frutescens*	**X**	✓	✓	**X**	**X**	20	0,28	1,40

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

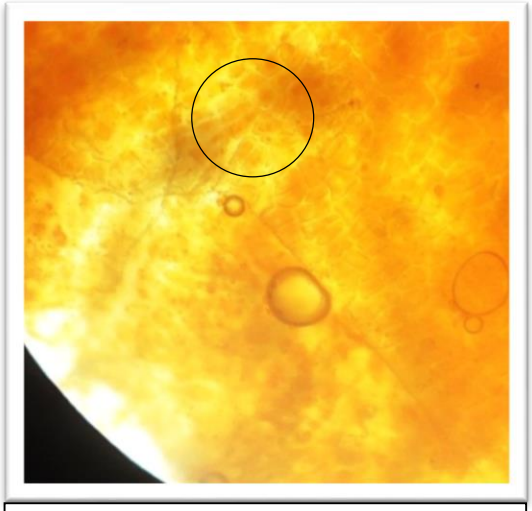
Se determinó el contenido de elementos extraños procedentes de la planta originaria (partes no usadas), así como también, sustancias externas, que pueden ser de procedencia vegetal (partes de otras especies vegetales), animal (plumas, pelos, heces) o mineral (tierra, arena piedras). La cantidad de materias extrañas contenidas en las muestras analizadas se encuentran en un rango de entre el 1,40-2,05%, promedios aceptables de control de calidad, según la Farmacopea Europea el nivel de materias extrañas no debe ser mayor al 2%.En su mayoría se encontró polvo y piedras, esto debido a que la altura de las plantas no sobrepasa 1,5 metros. Dentro de las especies, la que mayor contenido de materias extrañas se encontró fue *Capsicum baccatum*, esto posiblemente a un mal manejo del material recolectado y a las condiciones del cultivo.

4.5. Análisis microscópico (histológico)

Los órganos vegetales están constituidos por tejidos, cada uno de los cuales desempeña una función esencial en la vida de la planta, los cuales poseen una estructura típica que es importante para su identificación (Ahmed M, 2005).

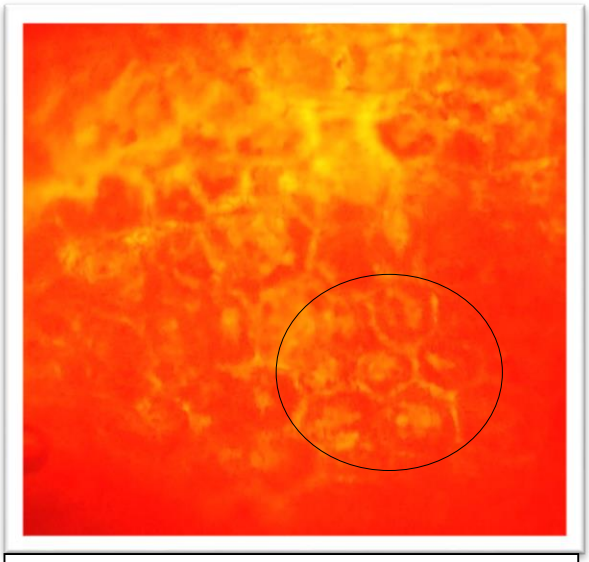
Los estudios se realizaron con cortes longitudinales muy finos, el agente aclarante que se utilizo fue agua destilada.

Figura 23. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. baccatum* mostrando gránulos de almidón en células parenquimáticas



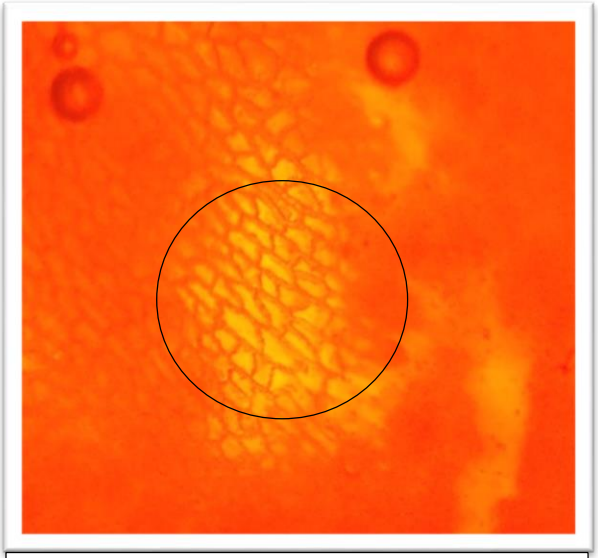
Preparación: Agente aclarante utilizado agua destilada
Aumento: 40X
Especie: *Capsicum baccatum*

Figura 24. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. chinense* mostrando en células parenquimáticas poco diferenciadas



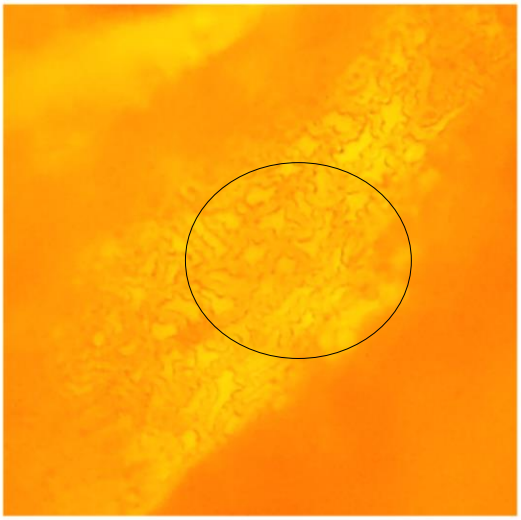
Preparación: Agente aclarante utilizado agua destilada
Aumento: 40X
Especie: *Capsicum chinense*

Figura 25. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. pubescens* que muestra las paredes celulares del parénquima



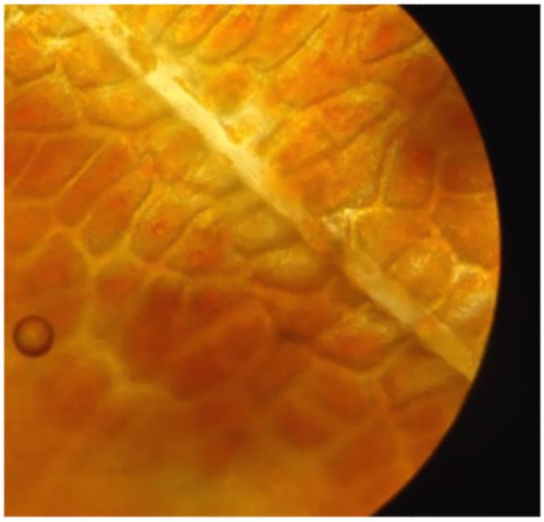
Preparación: Agente aclarante utilizado agua destilada
Aumento: 40X
Especie: *Capsicum pubescens*

Figura 26. Corte transversal del exocarpio del fruto de *C. annuum* que muestra células poco diferenciadas del parénquima



Preparación: Agente aclarante utilizado agua destilada
Aumento: 40X
Especie: *Capsicum pubescens*

Figura 27. Corte transversal de la pared placentaria del fruto de *C. frutescens* que muestra células parenquimáticas



Preparación: Agente aclarante utilizado agua destilada
Aumento: 100X
Especie: *Capsicum frutescens*

En las cinco muestras analizadas de *Capsicum*, se realizó un corte muestral del exocarpio y de la pared placentaria de los frutos de *Capsicum* spp., extrayendo una fina capa de la parte superior y colocándolas en un portaobjetos para realizar un montaje húmedo con los diferentes lentes, con lo cual se pudo identificar las estructuras de la pared celular, el citoplasma, lámina media, además de los canalículos existentes. Las principales estructuras que se pudieron evidenciar son las células parenquimáticas de reserva de almidón.

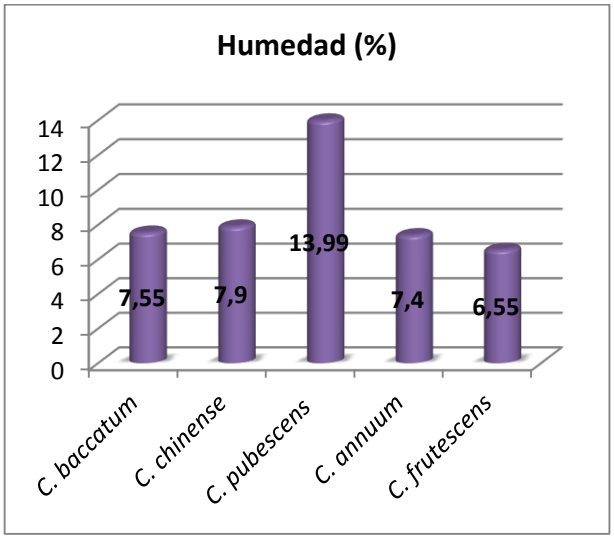
4.6. Métodos físico químicos aplicados al análisis de drogas

4.6.1. Parámetros de control de calidad. Ensayos físico químicos cuantitativos

4.6.1.1. Humedad

Se entiende como humedad a la cantidad de agua libre que contiene el material vegetal. Los resultados de humedad obtenidos al realizar el control de calidad de las muestras se encuentra dentro de los límites de agua establecidos según la norma NTE INEN 1114 para Especias y Condimentos (2010), que establece un valor máximo del 10%.

Figura 28. Porcentaje de humedad de los frutos secos de *Capsicum* spp.



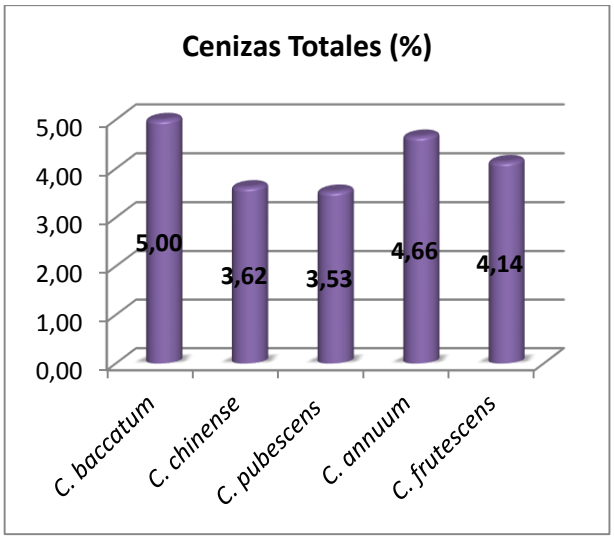
Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

La especie con mayor cantidad de humedad fue *C. pubescens* con un 13,99%, un valor alto en comparación a las otras especies, este se presume se produjo por presentar un mayor tamaño del pericarpio, y un alto contenido de oleorresina.

4.6.1.2. Cenizas Totales

Un indicador cuantitativo importante dentro del control de calidad de las drogas es el valor correspondiente a las cenizas totales, el cual proporciona una idea de la cantidad de componentes inorgánicos en la droga (Martinez, 2007).

Figura 29. Porcentaje de Cenizas totales de las muestras de *Capsicum* spp.



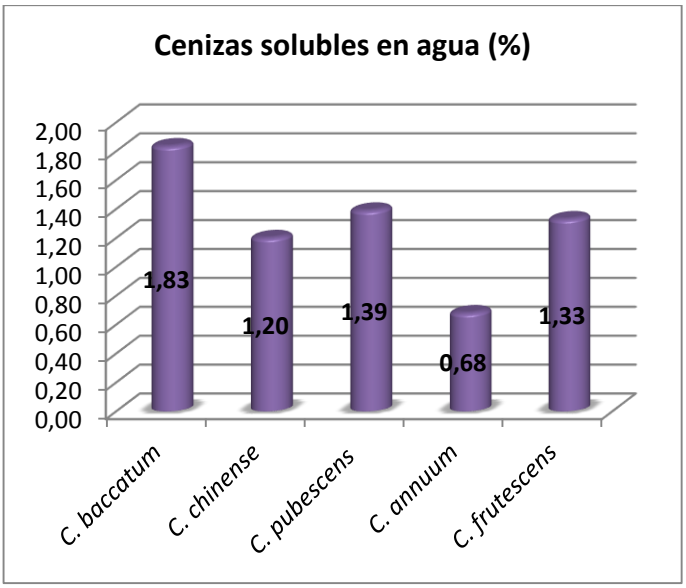
Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Las cenizas totales mostraron valores entre 3,5 y 5%, por debajo del 8,5% que se señala como límite superior la norma NTE INEN1117 para Especias y Condimentos (2010), por lo que en este análisis, los valores obtenidos se encuentran en el rango aceptable para este parámetro, lo cual está en dependencia de la composición en minerales del suelo donde se desarrolla la especie

4.6.1.3. Cenizas solubles en agua

Este análisis nos da una idea de la cantidad de componentes alcalinos térreos presentes en la droga. La literatura científica indica que estas deben estar por debajo del 2% para plantas medicinales.

Figura 30. Porcentaje de Cenizas Solubles en agua de las muestras de *Capsicum* spp.



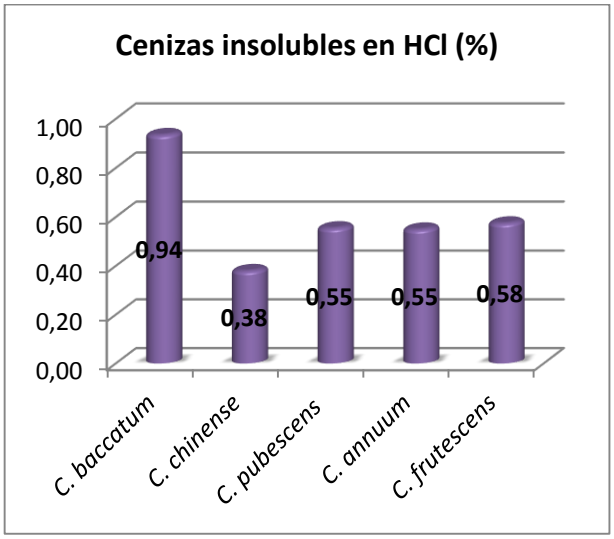
Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Los valores de cenizas solubles en agua obtenidos se encuentran entre 0,68 y 1,83. Estos valores no superan los índices establecidos.

4.6.1.4. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%

Este procedimiento permitió determinar la cantidad de sílica, principalmente arena y tierra silícea presentes en las muestras vegetales, como muestra la siguiente figura.

Figura 31. Porcentaje de Cenizas insolubles de ácido clorhídrico 10% de las muestras de *Capsicum* spp.



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico estuvieron en un rango entre 0,35 y 0,94%, valores que son aceptables para drogas vegetales (Martinez, 2007).

Cuadro 25. Resumen de los valores obtenidos en los ensayos físico químicos cuantitativos de control de calidad comparados con la normas para especias y condimentos.

Especie	Cenizas totales (%)	NTE INEN 1117 Max. %	Cenizas solubles en agua (%)	NMX-F-260-1978 Max. %	Cenizas insolubles en HCl (%)	NTE CONVENIN 1539-80	Humedad (%)	NTE INEN 1114 Max. %
C. baccatum	4,99	8,5	1,83	2,0	0,94	2,0	7,55	10,0
C. chinense	3,62	8,5	1,20	2,0	0,38	2,0	7,90	10,0
C. pubescens	3,53	8,5	1,39	2,0	0,55	2,0	13,99	10,0
C. annuum	4,66	8,5	0,68	2,0	0,55	2,0	7,40	10,0
C. frutescens	4,14	8,5	1,33	2,0	0,58	2,0	6,55	10,0

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

4.6.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico de las muestras de *Capsicum* se realizó con el objetivo de conocer su composición en metabolitos secundarios. Se obtuvo tres tipos de extractos para el tamizaje: etéreo, etanólico y acuoso, de los cuales se muestra los resultados en el Cuadro 22.

Figura 32. Extractos etéreos para tamizaje fitoquímico

Fuente: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Después de realizar el análisis fitoquímico de *Capsicum* se encontró en el extracto etéreo una importante cantidad de alcaloides, en el ensayo para aceites y grasas se obtuvo altas cantidades en *C. chinense y C. pubescens*, moderadas en *C. annuum* y *C. frutescens* y

baja cantidad en *C. baccatum;* mostrando una reacción negativa para triterpenos y esteroides.

Cuadro 26. Resultados del Tamizaje fitoquímico de las especies de *Capsicum*

METABOLITO	ENSAYO	EXTRACTO	*C. baccatum*	*C. chinense*	*C. pubescens*	*C. annuum*	*C. frutescens*
Aceites y grasas	Sudan	Etéreo	+	+++	+++	++	++
Alcaloides	Dragendorff	Etéreo	+++	+++	+++	+++	+++
	Wagner	Alcohólico	+++	+++	+++	+++	+++
		Acuoso	-	-	-	-	-
Triterpenos esteroides	Lieberman-Burchard	Etéreo	-	-	-	-	-
Lactonas y coumarinas	Baljet	Etanólico	-	-	-	-	-
Resinas	Resinas	Etanólico	+	+++	+++	++	++
Compuestos fenólicos y taninos	Cloruro férrico	Etanólico	+	+	+	+	+
Azúcares reductores	Fehling	Acuoso	+	+	+	+	+
Saponinas	Espuma	Etanólico	+	+	-	+	+
Glicosidos cardiotónicos	Kedde	Etanólico	-	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	Etanólico	-	-	-	-	-
Aminoácidos libres o aminas en general	Ninhidrina	Etanólico	+	+	+	+	+
Antocianidinas	Antocianidinas	Acuoso	-	-	-	-	-
Mucílagos	Mucílagos	Acuoso	-	-	-	-	-
Principios astringentes y amargos		Acuoso	+	+	+	+	+

(+) Significa que se obtuvo una respuesta positiva de poca cantidad para ese metabolito en el extracto.
(++) Significa que se obtuvo una respuesta positiva de mediana cantidad para ese metabolito en el extracto.
(+++) Significa que se obtuvo una respuesta positiva de mayor cantidad para ese metabolito en el extracto.
(-) Significa que se obtuvo una respuesta negativa para ese metabolito en el extracto

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

En el análisis del extracto etanólico se encontró la presencia significativa de resinas grasas y aceites, compuestos fenólicos/taninos y aminas en cantidades significativas; cantidad moderada de saponinas en todos los extractos menos en *C. pubescens* que no

mostró ninguna reacción al ensayo. No se encontró lactonas y cumarinas, glicósidos cardiotónicos ni flavonoides. En el extracto acuoso se obtuvo la presencia de azúcares reductores, principios amargos y astringentes y no se encontró mucílagos ni antocianidinas.

4.6.3. Rendimiento de los extractos de las especies de C*apsicum*.

Posterior a la extracción de las oleorresinas se procedió al cálculo del rendimiento de las mismas, lo cual, es un parámetro importante para la posterior cuantificación de capsaicina, las especies analizadas mostraron mucha variabilidad en la cantidad de oleorresinas obtenidas, como se muestra en el siguiente cuadro:

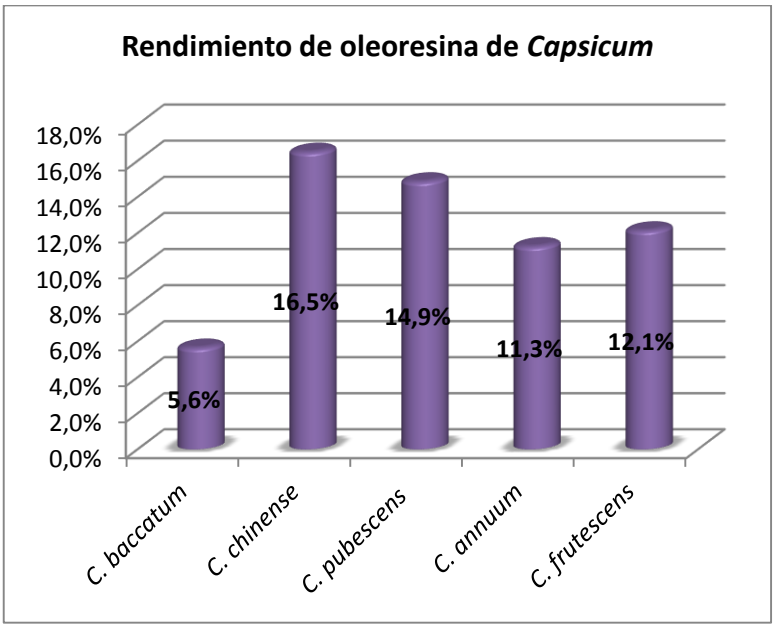
Cuadro 27. Extracción de oleorresina y cálculo del rendimiento

Rendimiento de la oleorresina de *Capsicum*					
Nombre científico	**Nombre común**	**Peso del fruto seco (g)**	**Volumen de disolvente (mL)**	**Peso de la oleorresina (g)**	**Rendimiento**
Capsicum baccatum	cereza1	25,1	200	1,3353	5,3%
	cereza2	25,0	200	1,4474	5,8%
	cereza3	25,2	200	1,4647	5,8%
		PROMEDIO			**5,6%**
Capsicum chinense	habanero1	25,3	200	4,2618	16,8%
	habanero2	25,1	200	4,0787	16,2%
	habanero3	25,2	200	4,1278	16,4%
		PROMEDIO			**16,5%**
Capsicum pubescens	rocoto1	25,1	200	3,7079	14,8%
	rocoto2	25,1	200	3,8797	15,5%
	rocoto3	25,0	200	3,5839	14,3%
		PROMEDIO			**14,9%**
Capsicum annuum	raton1	25,0	200	2,8025	11,2%
	raton2	25,1	200	2,7983	11,1%
	raton3	25,2	200	2,8822	11,4%
		PROMEDIO			**11,3%**
Capsicum frutescens	tabasco1	25,1	200	3,1295	12,5%
	tabasco2	25,0	200	3,0563	12,2%
	tabasco3	25,0	200	2,9345	11,7%
		PROMEDIO			**12,1%**

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

La especie que mostró mayor cantidad de oleorresina fue *C. chinense*, seguida de *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. annuum.* y *C. baccatum.* Las oleorresinas obtenidas poseen variación significativa en sus características organolépticas como el color que parece variar según el rendimiento de las mismas pasando desde el color vino obscuro de *C. chinense* y *C. baccatum*, color rojo anaranjado para *C. frutescens* y *C. annuum* hasta llegar al color naranja de *C. baccatum.* Otra de las características importantes que se pudo observar en las oleorresinas es su consistencia, obteniéndose de *C. baccatum* la oleorresina de consistencia más sólida y de mayor dificultad para disolverse en los solventes utilizados.

Figura 33. Rendimiento de oleorresina de *Capsicum* spp.



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

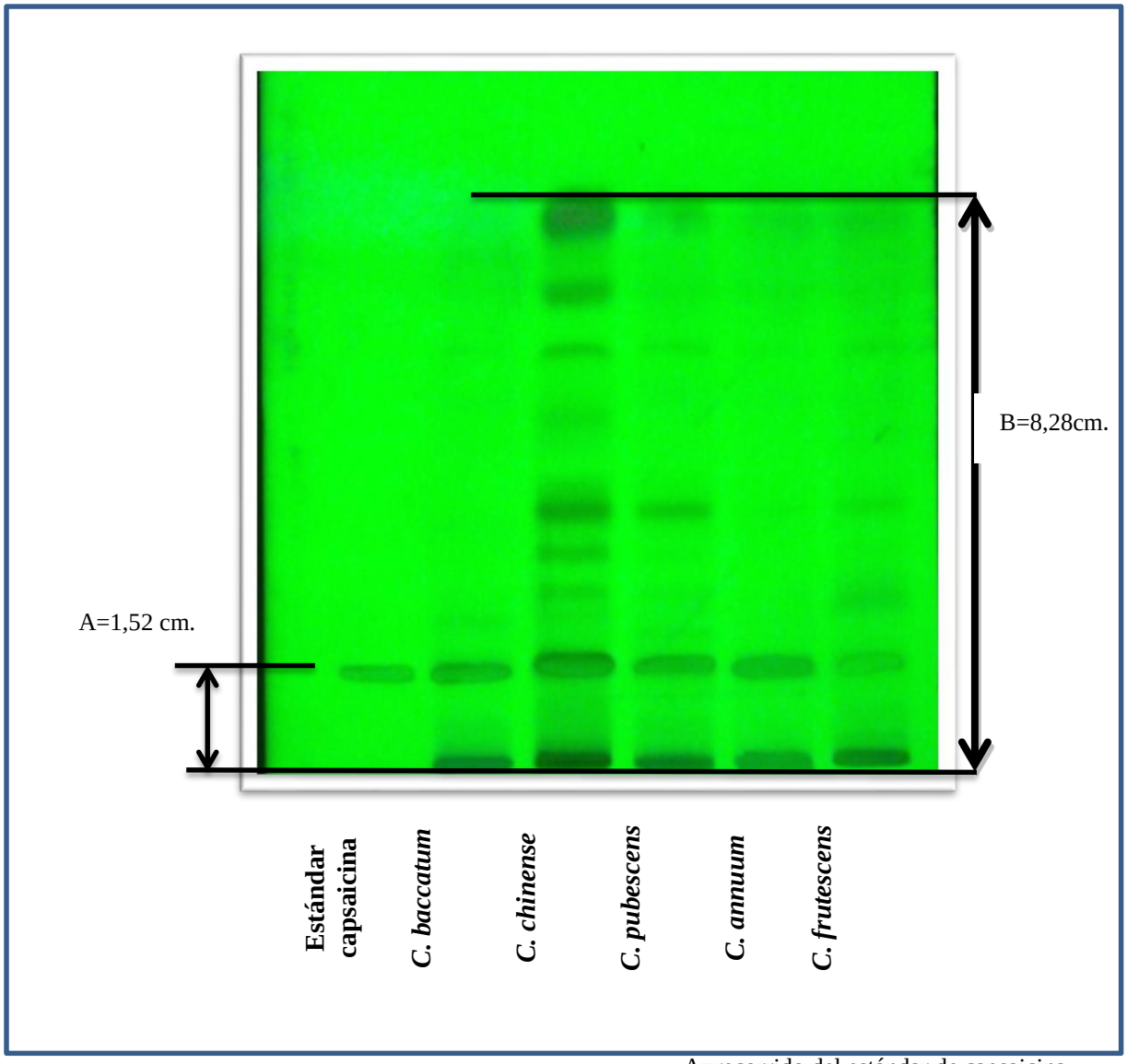
4.7. Identificación de capsaicina en las oleorresinas por TLC

4.7.1. Preparación de las muestras

Las oleorresinas obtenidas se analizaron mediante TLC utilizando sílica gel como soporte y una mezcla de éter etílico y hexano en proporción de 3:1 como fase móvil, disolventes utilizados por su polaridad.

La capsaicina presenta una leve florescencia al exponerla a una longitud de onda UV de 254 nm lo que permitió su identificación. Al comparar el estándar USP con las muestras analizadas se observan las bandas ubicadas a la misma altura como se puede observar en la figura 34.

Figura 34. Calculo del rf., para capsaicina en placa cromatografíca observada a 254 nm.



A=recorrido del estándar de capsaicina
B=recorrido total de las muestras

$$Rf = \frac{1{,}52}{8{,}28} = 0{,}1835$$

Se obtuvo un Rf calculado de 0,1835 tanto para el estándar de capsaicina como para las muestras de *Capsicum* a 254 nm, lo cual indicó la presencia de este principio activo en las muestras analizadas, la coloración de las manchas obtenidas proporcionó una idea de la concentración de capsaicina en cada una de las especies. La mancha más pronunciada pertenece al *Capsicum chínense* lo que indica que esta especie posee una mayor cantidad de capsaicina frente a las otras muestras analizadas, lo que se evidenció posteriormente con el análisis en HPLC respectivo.

4.8. Cuantificación de Capsaicina mediante HPLC

4.8.1. Curva de calibración para Capsaicina

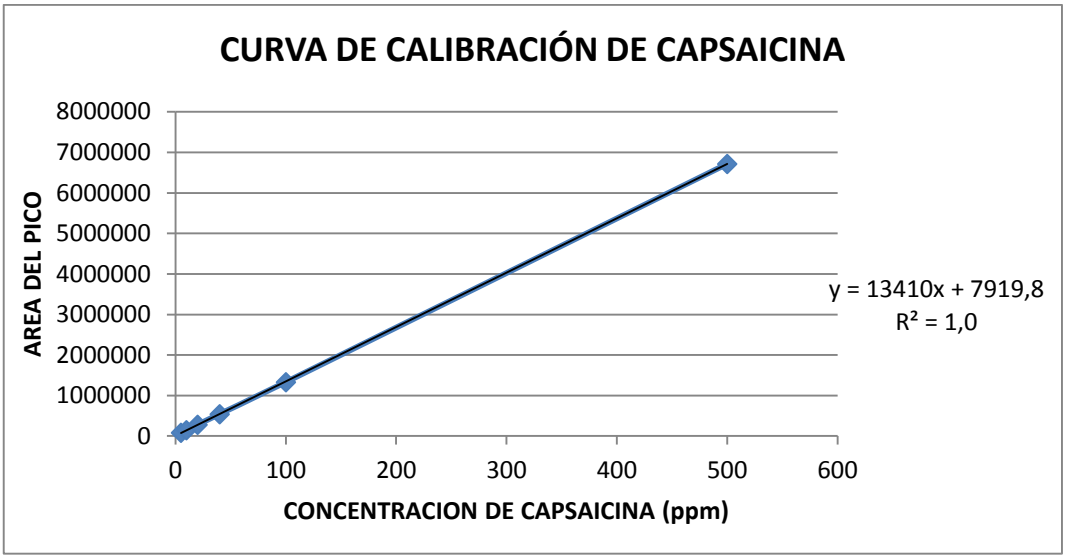
Se realizó la curva de calibración par el estándar de capsaicina con diluciones de 5, 10, 20, 40, 100 y 500 ppm en metanol grado HPLC, para los cuales se obtuvo las siguientes áreas de los picos:

Cuadro 28. Área de los picos de las diluciones del estándar de Capsaicina

CONCENTRACIÓN (ppm)	ÁREA DEL PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN
5	81646	2,675
10	144551	2,677
20	280733	2,675
40	544336	2,675
100	1332003	2,674
500	6716001	2,675

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Figura 35. Curva de calibración de capsaicina obtenida mediante HPLC



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Del análisis de la pendiente de la recta correspondiente al estudio de linealidad (y=13410x+7919,8) se deduce una buena sensibilidad del método para cuantificación de capsaicina al obtener un coeficiente de correlación igual a 1.

4.8.2. Cuantificación de Capsaicina de las cinco especies de *Capsicum* mediante HPLC

Los cromatogramas permitieron identificar los picos de absorción con tiempos de retención promedio de 2,675 minutos para la capsaicina al usar como fase móvil una solución de metanol 60%: agua 20%: acetonitrilo 20%.

Hubo una serie de picos adicionales no identificados, los cuales probablemente corresponderían a los otros capsaicinoides presentes en las oleorresina, los cuales se podrían identificar utilizando estándares externos. (Véase Anexo 9)

Cuadro 29. Concentración de capsaicina en *Capsicum baccatum* (ají cereza)

Muestra	Identificador	Rendimiento Oleorresina (%)	Oleorresina (mg)	Área	Concentración (ppm)	Concentración (mg/kg)
1	BAC1-1	5,33	201,4	4891456	364,17	963,77
2	BAC1-2	5,33	200,9	4547453	338,52	898,11
3	BAC1-3	5,33	204,5	4263595	317,35	827,13
4	BAC2-1	5,79	205,3	6911814	514,83	1451,96
5	BAC2-2	5,79	203,8	6874121	512,02	1454,66
6	BAC2-3	5,79	209,6	6847974	510,07	1409,02
7	BAC3-1	5,81	201,2	5634242	419,56	1211,56
8	BAC3-2	5,81	200,8	5203452	387,44	1121,02
9	BAC3-3	5,81	202,3	5354252	398,68	1145,01
					PROMEDIO	1164,69

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 30. Concentración de capsaicina en *Capsicum chinense* (ají habanero)

Muestra	Identificador	Rendimiento Oleorresina (%)	Oleorresina (mg)	Área	Concentración (ppm)	Concentración (mg/kg)
1	CHI1-1	16,85	203,5	1963360	145,82	12074,00
2	CHI1-2	16,85	205,4	1999078	148,48	12180,82
3	CHI1-3	16,85	201,8	2011175	149,39	12473,44
4	CHI2-1	16,25	200,9	1873425	139,11	11252,30
5	CHI2-2	16,25	205,8	1798273	133,51	10541,88
6	CHI2-3	16,25	203,4	1856666	137,86	11014,15
7	CHI3-1	16,38	202,4	1796963	133,41	10796,81
8	CHI3-2	16,38	201,3	1802354	133,81	10888,52
9	CHI3-3	16,38	204,5	1822341	135,30	10837,52
					PROMEDIO	11339,94

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 31. Concentración de capsaicina en *Capsicum pubescens* (ají rocoto)

Muestra	Identificador	Rendimiento Oleorresina (%)	Oleorresina (mg)	Área	Concentración (ppm)	Concentración (mg/kg)
1	PUB1-1	14,77	203,5	1203980	89,19	647,35
2	PUB1-2	14,77	202,1	1173283	86,90	635,11
3	PUB1-3	14,77	204,6	1193507	88,41	638,23
4	PUB2-1	15,46	206,3	961423	71,10	532,85
5	PUB2-2	15,46	201,5	962351	71,17	546,07
6	PUB2-3	15,46	202,2	963791	71,28	545,00
7	PUB3-1	14,34	205,7	1227214	90,92	633,86
8	PUB3-2	14,34	204,6	1209182	89,58	627,85
9	PUB3-3	14,34	203,9	1144605	84,76	596,13
					PROMEDIO	600,27

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 32. Concentración de capsaicina en *Capsicum annuum* (ají ratón)

Muestra	Identificador	Rendimiento Oleorresina (%)	Oleorresina (mg)	Área	Concentración (ppm)	Concentración (mg/kg)
1	ANN1-1	11,21	206,5	7247208	539,84	2930,57
2	ANN1-2	11,21	204,7	6550933	487,92	2672,00
3	ANN1-3	11,21	203,1	6669140	496,74	2741,70
4	ANN2-1	11,15	205,3	7136997	531,62	2887,29
5	ANN2-2	11,15	204,1	7204648	536,67	2931,83
6	ANN2-3	11,15	203,6	7213733	537,35	2942,74
7	ANN3-1	11,44	207,4	7931466	590,87	3259,18
8	ANN3-2	11,44	204,9	7907969	589,12	3289,16
9	ANN3-3	11,44	205,6	7897480	588,33	3273,61
					PROMEDIO	**2992,01**

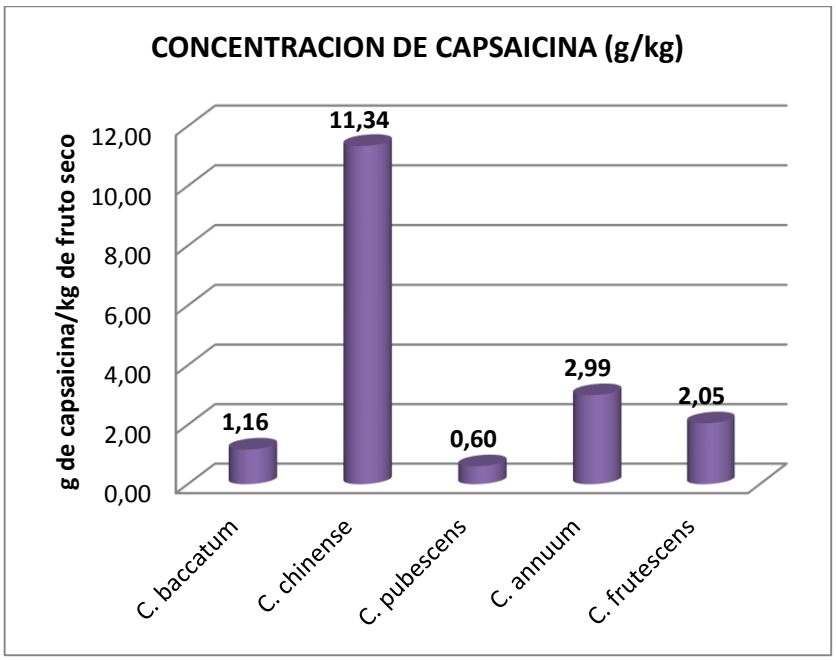
Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Cuadro 33. Concentración de Capsaicina en *Capsicum frutescens* (ají tabasco)

Muestra	Identificador	Rendimiento Oleorresina (%)	Oleorresina (mg)	Área	Concentración (ppm)	Concentración (mg/kg)
1	FRU1-1	12,47	204,3	5355992	398,81	2434,26
2	FRU1-2	12,47	205,1	5816945	433,19	2633,75
3	FRU1-3	12,47	202,5	5806016	432,37	2662,55
4	FRU2-1	12,23	203,7	3426893	254,96	1530,74
5	FRU2-2	12,23	204,3	3535828	263,08	1574,88
6	FRU2-3	12,23	206,3	3532550	262,84	1558,16
7	FRU3-1	11,74	203,5	4144680	308,48	1779,65
8	FRU3-2	11,74	206,3	5227325	389,22	2214,94
9	FRU3-3	11,74	205,5	4775346	355,51	2031,01
					PROMEDIO	**2046,66**

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Figura 36. Concentración de Capsaicina en g/kg de fruto seco en *Capsicum* sp.



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

La concentración de capsaicina se encontró dentro de un rango de 0,60-11,34g/kg de fruto seco para las cinco especies de. Siendo *Capsicum chinense* el de mayor concentración 11,34 g/kg de fruto seco sobrepasando el contenido reportado por: Cisneros Pineda *et al* (2007) 7,27 g/kg en habaneros naranja y por Borges *et al* (2010) 8,47 g/kg de fruto seco.

En cuanto a porcentaje el contenido promedio de Capsaicina que surge del análisis de la oleorresina obtenida a partir de los frutos de la especies de *Capsicum* es de: *Capsicum baccatum* 0,12%, *Capsicum chinense* 1,13%, *Capsicum pubescens* 0,06%, *Capsicum annuum* 0,3% *y Capsicum frutescens* 0,2%.

4.9. Análisis estadístico

Una vez obtenidos los valores de la concentración de la capsaicina se procedió a realizar el análisis estadístico, en este se aplicó el Análisis de Varianza y la prueba de medias de Tukey para determinar si existió una diferencia estadísticamente significativa en el contenido de capsaicina entre las especies.

Se confirmó la normalidad de los datos de manera previa aplicando la prueba de Shapiro Wilk y se procedió a realizar el análisis de varianza de una vía.

4.9.1. Análisis de Varianza (ANOVA)

- **Hipótesis nula:** Todos los promedios de concentración de capsaicina en las especies de *Capsicum* analizadas son estadísticamente similares.
- **Hipótesis alternativa:** Al menos uno de los promedio de concentración de capsaicina en las especies de *Capsicum* analizadas son diferentes.
- **Nivel de significancia (alfa):** 0.05
- **Estadístico de la prueba:** *F*

Cuadro 34. Concentración de Capsaicina (mg/kg) en las cinco especies de *Capsicum*

Muestra	*C. baccatum*	*C. chinense*	*C. pubescens*	*C. annuum*	*C. frutescens*
1	963,77	12074,00	647,35	2930,57	2434,26
2	898,11	12180,82	635,11	2672,00	2633,75
3	827,13	12473,44	638,23	2741,70	2662,55
4	1451,96	11252,30	532,85	2887,29	1530,74
5	1454,66	10541,88	546,07	2931,83	1574,88
6	1409,02	11014,15	545,00	2942,74	1558,16
7	1211,56	10796,81	633,86	3259,18	1779,65K
8	1121,02	10888,52	627,85	3289,16	2214,94
9	1145,01	10837,52	596,13	3273,61	2031,01

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Los datos anteriores pueden caracterizarse por el siguiente cuadro de resumen:

Cuadro 35. Parámetros estadísticos para la concentración de Capsaicina en las especies de *Capsicum*

	C. baccatum	*C. chinense*	*C. pubescens*	*C. annuum*	*C. frutescens*
Sumatoria	10482,24	102059,43	5402,46	26928,08	18419,94
Media	1164,69	11339,94	600,27	2992,01	2046,66
Desviación Estándar	238,79	709,99	46,52	230,44	461,18

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

A partir de los datos originales calculamos el estadístico *F*. Después del proceso de cálculo respectivo, se obtuvo el siguiente cuadro como resultado:

Cuadro 36. Cálculo del estadístico *F* para el ANOVA

CÁLCULO DEL ESTADISTICO F						
Fuente de variación	**Grados de libertad**	**Suma de cuadrados**	**Cuadrados medios**	**F**	**P**	**Criterio**
Tratamiento (entre grupos)	4	6.985E+08	1,74E+08			
Error (dentro de grupos)	40	6630381	165760	1054	0,000	Aceptada la hipótesis alternativa
Total	44	7.052E+08				

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Con lo cual se logró determinar que existe al menos una especie de *Capsicum* que presenta una concentración de capsaicina diferente a la de las otros grupos ($p<0,05$).

Para determinar cuál de las especies es la que posee una concentración de capsaicina diferente se procedió a la aplicación de un test aposteriori, la Prueba de Tukey, la cual dio como resultado que todas las especies son diferentes entres si tomando en cuenta el contenido de capsaicina que presenta cada una de las cinco especie de *Capsicum* analizadas.

Cuadro 37. Resultados de la Prueba de Tukey para contenido de capsaicina

Prueba de Tukey		
Variable	**Promedio**	**Grupos Homogéneos**
C. chinense	11340,0	A
C. annuum	2992.0	B
C. frutescens	2046.8	C
C. baccatum	1164.8	D
C. pubescens	600.22	E

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Siendo el *Capsicum chinense* la especie con mayor contenido de capsaicina, seguida de *Capsicum annuum, Capsicum frutescens, Capsicum pubescens* y finalmente *Capsicum baccatum* (véase Anexo 7)**.**

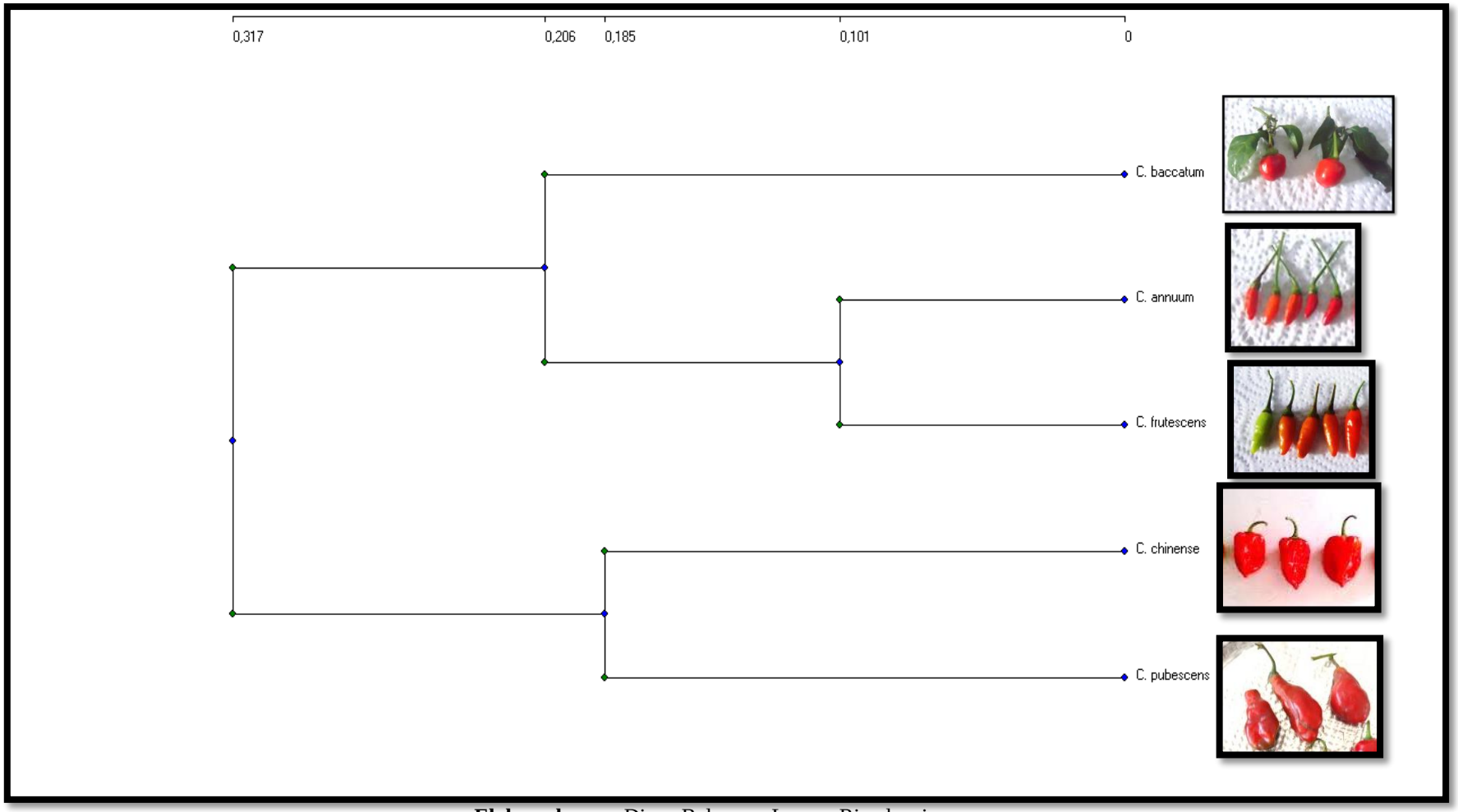
4.9.2. Análisis de Clúster

Durante la exploración y colecta de las muestras de *Capsicum*, se evaluaron *in situ* varios caracteres morfológicos en planta, flor y fruto, los cuales fueron diferenciados en descriptores cualitativos y cuantitativos (Cuadro 17,18 y 19). Estas observaciones se efectuaron de acuerdo al manual de descriptores morfológicos para *Capsicum* propuesto por CATYE (1995). Cuando el sitio de recolección fue una siembra comercial, las variables se midieron en 20 plantas tomadas al azar dentro de la parcela. En jardines se incluyó el total de plantas de cada morfotipo (n = 10 en promedio) que se encontraron al momento de realizar el estudio. De la siembra comercial se tomaron al menos 10 frutos maduros; en ellos se midieron las variables: largo y ancho.También se incluyó los datos de análisis de control de calidad tanto de la droga vegetal como de la oleorresina y la concentración de capsaicina en las especies.

En el dendograma queda reflejada la formación de dos conglomerados, así como la distancia entre ellos. Se puede comprobar que la observación más distante pertenece al *Capsicum baccatum,* ya que es la última en incorporarse al clúster. Por el contrario las observaciones más cercanas pertenecen al agrupamientos entre *C. annuum* y *C. frutescens* que forman el primer grupo, observando la matriz de los datos que intervinieron en el análisis se puede deducir que estas especies se agruparon debido a su forma, tamaño, color y contenido medio de capsaicina (0,205 y 0,299% respectivamente) el cual posteriormente se agrupo con *C. baccatum,* especie con la cual comparten características tanto morfológicas como químicas. El segundo grupo formado por *C. chinense* y *C. pubescens* muestran características tanto químicas como morfológicas en común: forma y color tanto del fruto, tamaño de la planta, pero la concentración de capsaicina difiere mucho en estas dos especies, *C. chinense* presenta altos niveles de capsaicina 1.13%, mientras que *C. pubescens* fue la especie que menor porcentaje presentó alrededor del 0,06%.

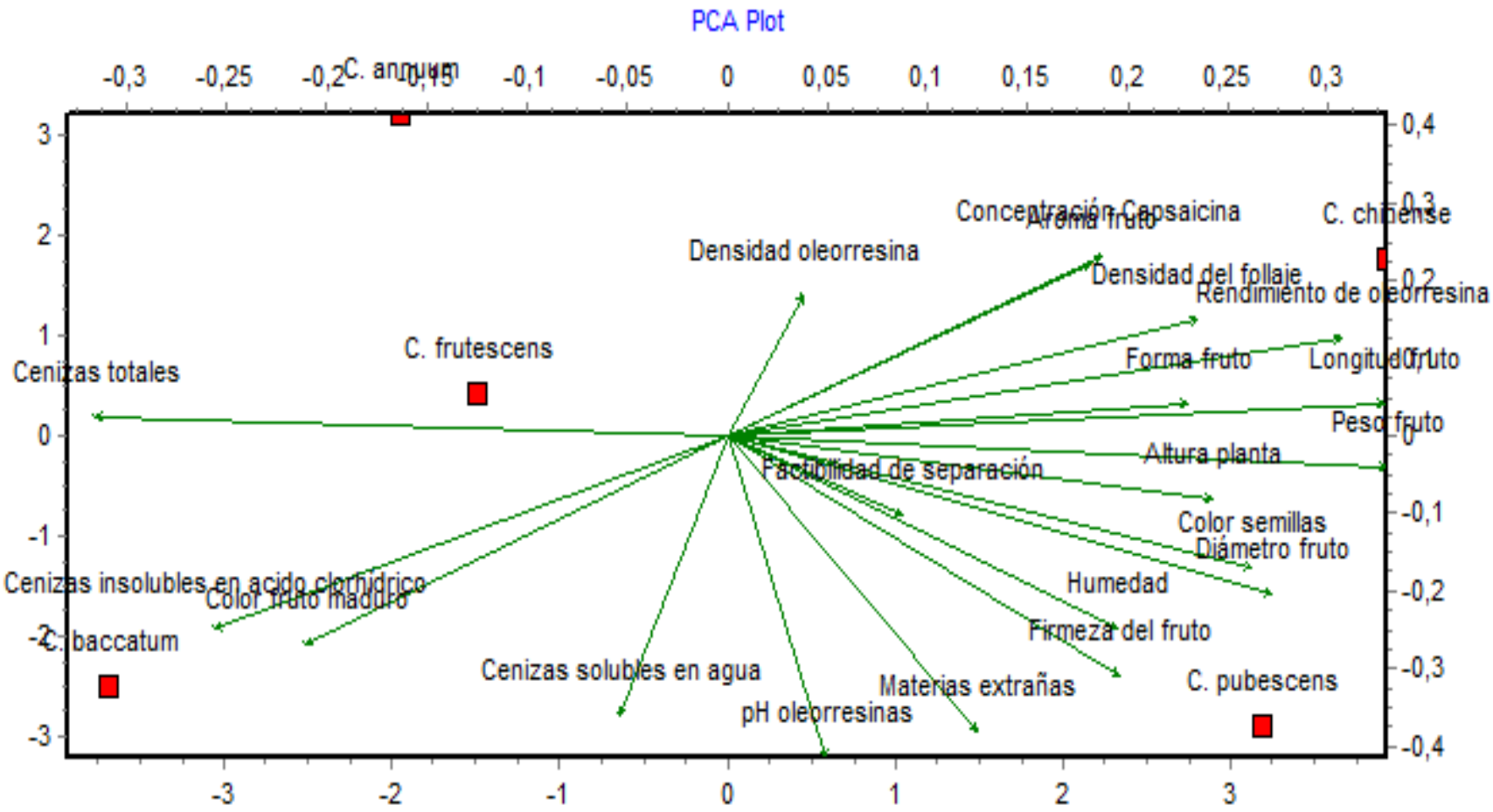
El parámetro determinante en el agrupamiento de los conglomerados fue la concentración de capsaicina en los frutos de *Capsicum* en cada una de las especies, al ser miembros de un mismo género poseen características muy similares entre sí con ligeras variaciones tanto morfológicas como químicas.

Figura 37. Dendograma que muestra la similitud entre las especies de *Capsicum* estudiadas



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Figura 38. Análisis de componentes principales PCA



Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

El análisis de componentes principales (ACP) indicó que las cinco especies de *Capsicum* guardan estrechas relaciones entre sí, como se muestra en el dendograma las especies que presentan más características en común se agrupan en dos conglomerados. El primero formado por: *C. annuum, C. frutescens y C. baccatum* los cuales en el análisis de componentes se ubican muy cercanos compartiendo las características como: cenizas totales, cenizas insolubles en ácido clorhídrico y color de fruto maduro. Mientras que *C. chinense* y *C. pubescens* muestran características morfológicas en común tales como: altura de la planta, longitud y peso del fruto, entre otras. En cuanto al contenido de capsaicina, que es la principal característica del estudio, *C. chinense* es la especie que más concentración de capsaicina posee muy por encima de las otras cuatro.

Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville (SHU)

El nivel del pungencia es un parámetro de calidad de los frutos de *Capsicum* sp.

Cuadro 38. Escala Scoville y las principales variedades de *Capsicum* spp.

Unidad Scoville	Variedad/Chile
850,000-1,001,304	Bhut Jolokia (India, Sri Lanka)
350.000 - 577.000	Red Savina Habanero (California, Usa)
100.000 - 350.000	Chile Habanero
100.000 - 325.000	Scotch Bonnet
100.000 - 200.000	Chile Jamaicano
50.000 - 100.000	Chiltepe, Piquín,Chile Thai
30.000 - 50.000	Pimienta Cayenna , Chile Tabasco
10.000 - 30.000	Chile Serrano , Chile de árbol
2.500 - 8.000	Chile Jalapeño
2.500 - 5.000	Salsa Tabasco
1.000 - 1.500	Chile Poblano
0	Chile Dulce(Pimiento dulce, Chile verde)

Fuente: (Peralta Calito, 2007)

Cuadro 39. Valores de la concentración de Capsaicina en Unidades Scoville (SHU)

ESCALA SCOVILLE PARA LAS ESPECIES DE *Capsicum* ANALIZADAS		
ESPECIE	**CONCENTRACION (ppm)**	**SHU**
Capsicum baccatum	1164,69	17470,40
Capsicum chinense	11339,94	170099,05
Capsicum pubescens	600,27	9004,09
Capsicum annuum	2992,01	44880,14
Capsicum frutescens	2046,66	30699,90

Los promedios de los contenidos de capsaicina y su transformación a SHU, se calculó como una medida del grado de picor de cada especie, estando *Capsicum baccatum y Capsicum pubescens* en un grado de picor medio (5000-20000 SHU), *Capsicum annuum y Capsicum frutescens* mostraron niveles de picor elevado, destacándose *Capsicum chinense* la cual supera los 170 000 SHU.

CONCLUSIONES

En la especie *Capsicum chinense* se encontró la mayor concentración de capsaicina de las cinco especies estudiadas. El contenido promedio de capsaicina fue de 11,34 g/kg de fruto seco. En contraste, la especie *Capsicum pubescens* con un contenido de 0,60 g/kg de fruto seco es la especie con menor concentración de capsaicina. Estos resultados corroboran las conclusiones de otros estudios (Nuñez, Gil Ortega, & Costa García, 2003) que señalan que el contenido de capsaicina varia directamente con la temperatura. Los ejemplares recolectados de la especie *C. chinense* provienen de sectores con una temperatura promedio de 28˚C en tanto que *Capsicum pubescens* se cultiva en zonas con un promedio de temperatura menores (18-20˚C).

En cuanto a la escala de pungencia de Scoville los resultados obtenidos señalan un valor promedio de unidades Scoville comprendido en el rango acorde a lo encontrado en la bibliografía citada (Peralta Calito, 2007). Así *Capsicum chinense* presenta 170000 SHU; el reporte bibliográfico señala que esta especie presenta entre 100000-350000 SHU.

Los resultados muestran que el método seguido de extracción de la oleorresina (Anexo 5) ofrece una alta reproducibilidad en cuanto al rendimiento. Sin embargo, el contenido de capsaicina, manifiesto en el área bajo la curva, tiene una alta variabilidad. Las causas de esta variación se aducen a que las muestras obtenidas para la extracción de las oleorresina provienen de diferentes plantas de las cuales se desconoce la edad de los cultivos de donde fueron colectadas, así mismo no es conocido el exacto grado de maduración de los frutos; estos son factores determinantes en la biosíntesis de capsaicina, como indica Ben–Chaim (2006) y Nuñez, *et al* (2003).

Los resultados del análisis proximal para las cinco especies bajo estudio denotan concordancia con la información bibliográfica disponible a excepción del contenido de humedad en *Capsicum pubescens* cuyo valor (14%) sobrepasa el límite superior (8%) establecido en la norma NTE INEN 2532 (2010) para condimentos y especies.

El conocimiento del contenido de capsaicina de las especies bajo estudio indica que *Capsicum chinense,* conocido como ají habanero, es una especie con alto valor para la industria de los alimentos, especialmente en la elaboración de salsas y condimentos picantes. Además debido a su alto rendimiento es potencialmente interesante su utilización como materia prima para la extracción y purificación de capsaicina utilizada con fines investigativos y/o aplicaciones farmacéuticas.

RECOMENDACIONES

Es importante complementar con futuras investigaciones el estudio de la especie *Capsicum pubescens* para conocer la composición de la oleorresina dado que hay un alto rendimiento de la misma y un bajo contenido de capsaicina. El comportamiento de solubilidad de la oleorresina de esta especie así como el tamizaje fitoquímico y el análisis TLC hace presumir la existencia de otros componentes mayoritarios que pueden ser de interés farmacéutico o industrial.

Para un estudio más riguroso de la composición fitoquímica de estas especies, es importante contar con un diseño experimental que tome en cuenta las variables de: edad de los cultivos, procedencia y tipo de suelo, temperatura y otros factores que afectan directamente a la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular de los capsaicinoides.

Se puede complementar el conocimiento de estas cinco especies nativas del Ecuador con investigaciones que evalúen el contenido de otros capsaicinoides, por ejemplo dihidrocapsaicina y homohidrocapsaicina, que poseen igualmente un alto valor comercial por sus posibles aplicaciones en el campo médico.

Tomando en cuenta la amplia documentación científica acerca del género *Capsicum*, al que se le atribuye importantes propiedades tanto a nivel socio económico como de investigación científica, se recomienda continuar con investigaciones que impulsen el aprovechamiento del prometedor potencial terapéutico de la Capsaicina y sus similares.

LISTA DE REFERENCIAS

Ahmed M, S. (2005). *Manual de farmacognosia. Análisis microscópico y fitoquímico, y uso de plantas medicinales.* Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos.

Andrews, R., & Abbot, D. (1992). *Introduccion a la cromatografía.* Madrid: Alhambra S.A.

Athanasiou, A., Smith, P. A., Vakilpour, S., Kumaran, N. M., Turner, A. E., Bagiokou, D., y otros. (2007). Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 50-55.

Ben–Chaim, A. Y. (2006). *QTL Analysis for capsaicinoid content in Capsicum.* Londres: Theor.

Borges, L., Cervantes, L., Ruiz, J., Soria, M., Reyes, V., & Villanueva, E. (2010). CAPSAICINOIDES EN CHILE HABANERO (Capsicum chinense Jacq.) DIFERENTES CONDICIONES DE HUMEDAD Y NUTRICIÓN. *TERRA LATINOAMERICANA* , 35-41.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales.* Zaragoza: Acribia S.A.

Chávez Servia, J. L., Tuxill, J., & Jarvis, D. I. (2004). *Manejo de la diversidad de los cultivos en los agrosistemas tradicionales.* Cali: Instituto Internacional de Recursos Fitogeneticos.

CYTED IV.20, P., & Decallasa, E. (2010). *Normalizacion de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana.* Porto Alegre: ediPCRS.

Djamgoz, M. B., & Isbilen, B. (2006). *Dietary compounds as anti–cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms.* Turkish: Biochem.

El ají nació en el Ecuador. (15 de Febrero de 2007). *El Universo* .

FAO. (2012). Recuperado el 18 de Mayo de 2012, de Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la agricultura: http://www.fao.org

Farinango Cervantes, D. (2007). Tesis Caracterización Molecular de la de la Coleccion de Ajíes (Capsicum spp.) y Calabazas (Curcubita spp.) Del Banco de Germoplasma del INIAP. Ibarra.

FDA, C. d. (1994). Fundación de desarrollo agropecuario. Santo Domingo , República Dominicana: Texto VICTORIANO.

Garcia-Barriga, H. (1992). *Flora medicinal de Colombia.* Bogotá: Tercer Mundo.

Grubben, G. (1977). *Tropical vegetables and their Genetic Resources.* Roma: IBPGR.

Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo.* Nueva York: Reverte.

Heiser, C. B. (1964). Los chiles y ajíes (Capsicums) de Costa Rica y Ecuador. *Ciencia y Naturaleza* , 50-57.

Joo, J., Kim, D., Choi, J., & Yun, J. (2010). Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in ratsAnálisis proteómico del potencial antiobesidad de la capsaicina en el tejido adiposo blanco de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. *PubMed* , 77-87.

León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales.* San José: Agroamérica.

López Aguilera, E. (5 de Enero de 2012). *Biochemistry2013*. Recuperado el 20 de Febrero de 2013, de Esperanza sobre el fin del dolor: http://biochemistry2013.wordpress.com

Manirakiza, P. A. (2003). *Pungency principles in Capsicum –analytical determinations and toxicology.* London: Taylor and Francis.

Martinez, I. (2007). *Manual de Fitoterapia.* Barcelona: MASSON.

McLeod, M., & Guttman, W. H. (2001). *A Preliminary Biochemical Systematic Study of the genus Capsicum-Solanaceae.* Boston : Biochemical.

Migdalia, M. (2002). *Metodos de análisis de drogas y extractos.* Habana: Universidad de la Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos.

Morán, H., Aguilar, H., Corona, T., Castillo, F., Soto, M., & San Miguel, R. (2008). Capsaiciniodes nativos de Puebla, México. *Agrociencia* , 807-816.

Muriel, C. (2007). *Dolor crónico.* España: Arán.

Navarro Albaladejo, F., & Costa García, J. (2000). *La Oleorresina Del Pimenton.* Murcia: Secretariado De Publicaciónes.

NTE INEN 2532. (2010). *Especias y Condimentos. Requisitos.* Quito.

Nuñez, F., Gil Ortega, R., & Costa García, J. (2003). *Cultivo de pimientos, chiles y ajíes.* Madrid: Mundi-Prensa.

Oblitas, P. (1992). *Plantas Medicinales en Bolivia.* La Paz: Los Amigos del Libro.

Pabón, G. (2006). *Caracterización Morfológica y Revisión Taxonómica de Capsicum spp.(Ajíes) y Curcubita spp (Calabazas) en la Granja de la UNORCAC, Cantón Cotacachi.* Tesis, Universidad Técnica del Norte, Instituto de Post-Grado, Maestría en Manejo de Recursos Naturales de Ibarra.

Paredes, A. (1955). *Plantas usadas por nuestros aborígenes.* Quito: Boletín del Instituto de Ciencias Naturales.

Peralta Calito, G. M. (2007). *Determinación del nivel de pungencia en Unidades Scoville para Capsicum annuum var. aviculare procedente de Regiones Productoras de Guatemala.* Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D., Berman, M., y otros. (2007). Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (Capsicum spp.L.) in the Americas. *Science* , 986-988.

Peter, K. (2008). *Underutilized and Underexploited Horticultural Crops.* New Delhi: Departament of Biotechnology, Kannur University, New Indian Publishing Agency.

Pickersgill, B. (1984). *Migrations of Chili Peppers, Capsicum spp.* Boston: Harvard University Press.

Pickersgill, B. (2007). The Domestication of Plants in the Americas. *Annals of Botany* , 925-940.

Real Farmacopea Española. (2002). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

Seguí Simarro, J. M. (2010). *Biología y biotecnología reproductivas de las plantas.* Valencia: Universidad Politécnica De Valencia.

Sein, G. O., Gardinali, C. A., Mandrile, E. L., & Cafferata, L. F. (1998). Cuantificación de Capsaicinoides en Capsicum chacoense A.T. Hunziker (Solanaceae) y en Especialidades Farmaceúticas. *Acta Farmaceútica Bonaerense* (págs. 5-10). La plata: Universidad Nacional de la Plata.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapeúticos.* Santa fé de Bogotá: Area de Ciencia Y Tecnología del Convenio Andrés Bello .

Skoog, D. A., Holler, J., & Stanley, R. (2008). *Principios De Análisis Instrumental.* Washington D.C.: Cengage Learning Inc.

Snyder, L. (1990). *High Performance Liquid Chromatography.* Nueva York: (C.Horváth.

Tazón, M., & Azcón Bieto, J. (2008). *Fundamentos De Fisiología Vegetal.* Madrid Barcelona: Mc Graw-Hill Interamericada.

Towell, J. L. (2005). *Los senderos prehispánicos del Capsicum.* Universidad Nacional Autonoma de Mexico: Instituto de investigaciones históricas .

Trease, G. E. (1998). *Farmacognosia.* Madrid: McGraw-Hill.

Ugas, R., Delgado de la Flor, F., Casas, A., & Toledo, J. (2000). *Hortalizas, Datos básicos.* Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Vacas Cruz, O. (2008). Hortalizas y condimentos andinos una delicia al paladar. *Nuestra Ciencia* (8), 40-43.

Valencia, D., Lawand Castañeda, S., & Willis, G. (2005). *Efecto de la brumetanida sobre los reflejos de raíz dorsal y la inflamación neurogénica inducidos por capsaicina.* Puebla: Memorias del XVII Congreso Nacional de Farmacologia.

Vega, M. (2001). *Etnobotánica de la amazonía peruana.* Quito: Abya Yala.

Waizel Bucay, J., & Camacho Morfín, R. (2011). El género Capsicum spp. una vision panoramica. *Aleph Zero* , 67-79.

Yeager, S. (2002). *La guía médica de remedios alimenticios.* EEUU: Rodale.

Zewdie, & Bosland. (2000). *Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in Capsicum annuum L.* Washington: Springer.

ANEXOS

Anexo 1. Artículo revista *Science*

Travel Grants for 15th International Congress of Immunology
Apply Now!

Science
AAAS

Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas

Linda Perry *et al*.

Science **315**, 986 (2007);
DOI: 10.1126/science.1136914

This copy is for your personal, non-commercial use only.

If you wish to distribute this article to others, you can order high-quality copies for your colleagues, clients, or customers by clicking here.

Permission to republish or repurpose articles or portions of articles can be obtained by following the guidelines here.

The following resources related to this article are available online at www.sciencemag.org (this information is current as of April 1, 2013):

Updated information and services, including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:
http://www.sciencemag.org/content/315/5814/986.full.html

Supporting Online Material can be found at:
http://www.sciencemag.org/content/suppl/2007/02/14/315.5814.986.DC1.html

A list of selected additional articles on the Science Web sites **related to this article** can be found at:
http://www.sciencemag.org/content/315/5814/986.full.html#related

This article has been **cited by** 30 article(s) on the ISI Web of Science

This article has been **cited by** 15 articles hosted by HighWire Press; see:
http://www.sciencemag.org/content/315/5814/986.full.html#related-urls

This article appears in the following **subject collections:**
Anthropology
http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anthro

Science (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published weekly, except the last week in December, by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright 2007 by the American Association for the Advancement of Science; all rights reserved. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas

Linda Perry,[1] Ruth Dickau,[2] Sonia Zarrillo,[2] Irene Holst,[3] Deborah M. Pearsall,[4] Dolores R. Piperno,[1,3] Mary Jane Berman,[5] Richard G. Cooke,[3] Kurt Rademaker,[6] Anthony J. Ranere,[7] J. Scott Raymond,[2] Daniel H. Sandweiss,[6,8] Franz Scaramelli,[9] Kay Tarble,[10] James A. Zeidler[11]

Chili peppers (*Capsicum* spp.) are widely cultivated food plants that arose in the Americas and are now incorporated into cuisines worldwide. Here, we report a genus-specific starch morphotype that provides a means to identify chili peppers from archaeological contexts and trace both their domestication and dispersal. These starch microfossils have been found at seven sites dating from 6000 years before present to European contact and ranging from the Bahamas to southern Peru. The starch grain assemblages demonstrate that maize and chilies occurred together as an ancient and widespread Neotropical plant food complex that predates pottery in some regions.

Chili peppers, members of the genus *Capsicum*, have been cultivated extensively, initially in the Americas and, after Columbus, around the globe (*1*, *2*). The lack of a comprehensive archaeobotanical record has hampered accurate reconstructions of the origins, domestications, and dispersals of these plants. Macroremains of the fruits are confined to rare sites in arid environments, and reports of seeds and pollen are even less common (Table 1). We found that a widespread, but previously unidentified archaeological starch morphotype is derived from chili pepper fruits and is commonly preserved on artifacts. We documented this microfossil from seven archaeological sites ranging from the Bahamas archipelago to Andean South America (Fig. 1) beginning 6000 years ago (Table 2).

The five most economically notable species of chili pepper are *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*. Although it is generally agreed that the genus *Capsicum* originated in Bolivia (*2*), the centers of domestication and dispersal patterns of these species remain speculative. A combination of archaeological evidence, genetic analyses, and modern plant distributions have led researchers to suggest that *C. annuum* was initially domesticated in Mexico or northern Central America, *C. frutescens* in the Caribbean, *C. baccatum* in lowland Bolivia, *C. chinense* in northern lowland Amazonia, and *C. pubescens* in the mid-elevation southern Andes (*2*, *3*).

All five species of domesticated chili peppers produce large, flattened lenticular starch grains with a shallow central depression, not unlike a red blood cell in appearance (Fig. 2, A to C). When rotated into side view, a central linear figure—a clean line or split figure with sharp edges—runs parallel to the long axis of the grain. This figure can extend for the entire length of the grain or just a part of it (Fig. 2, E and F). Ranging from about 13 to 45 μm in length, the starches of domesticated peppers are easily distinguishable from smaller wild types in the microfossil record (Fig. 2D and table S1). Although the basic three-dimensional morphology is consistent among all species of *Capsicum*, micromorphological characters differ between species.

Three of the species—*C. baccatum*, *C. frutescens*, and *C. pubescens*—can be identified on the basis of diagnostic morphotypes that have unique features of the central depression. However, these features are rare even in modern starch grain assemblages. Otherwise, the morphologies of starch grain assemblages from *C. annuum* and *C. frutescens* are so similar that, in the absence of a diagnostic, it is not possible to assign grains to a single species. The morphology of starch from *C. chinense* is similar to but not identical to that of *C. annuum* or *C. frutescens*, and the morphologies of all three starches differ significantly from those of *C. baccatum* and *C. pubescens* which, in turn, differ from one another. Because similar types occur in all congeneric species of *Capsicum*, either a diagnostic or a large archaeobotanical assemblage is required for a secure species identification.

The presence of a basic genus-diagnostic starch morphotype for *Capsicum* is predictable because of the lack of perfect barriers to intraspecific hybridization (*4*). *C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens* have been described as a species complex with a single ancestral gene pool (*4*). Therefore, it is not surprising that the starches of these three species are morphologically similar to one another. In contrast, *C. baccatum* and *C. pubescens* are distinct domesticated species in South America (*4*). Starches derived from other economically significant species in the Solanaceae including *Lycianthes*, the genus that recent phylogenetic studies indicate is the most closely related to *Capsicum* (*5*), differ from those of chili peppers (table S1 and fig. S1) (*6*). Thus, we have eliminated those plant species with the potential to confuse the source of the microfossils.

We recovered securely identified genus-diagnostic *Capsicum* starch microfossils from seven sites throughout the Americas. The oldest positively identified starches were found at the contemporaneous sites of Loma Alta and Real Alto in southwestern Ecuador. Interpreted as a village-sized, permanent settlement, Loma Alta was occupied for more than a millennium beginning about 6100 years before present (yr B.P.) (*7*). We recovered chili pepper starches from sediment samples, milling stones, and food residues from ceramic sherds of cooking vessels, all of which were excavated from the lower levels of the site.

Similar to Loma Alta, Real Alto was a village site at about 6100 yr B.P.; however, by about 4750 yr B.P., it had expanded into a regional ritual-ceremonial center (*8*, *9*). The chili starches were extracted from milling stones from two house floors dating to the period of expansion. Microfossil evidence of maize, *Canna edulis* (achira), *Maranta arundinacea* (arrowroot), *Calathea* sp.

Table 1. Published reports of archaeological *Capsicum* from well-dated sites with clearly defined stratigraphy.

Species	Plant part	Region	Site(s)	Date(s) (yr B.P.)	Source
C. annuum	Fruits	Mexico	Tehuacan Valley	500–6000	(*24*)
C. annuum	Seeds and peduncles	El Salvador	Ceren	1400	(*25*)
C. baccatum	Fruits	Peru	Huaca Prieta, Punta Grande	4000	(*26*)
C. chinense	Fruits	Peru	Huaca Prieta, Punta Grande	4000	(*26*)
C. chinense	Fruits	Peru	Casma Valley	Ca. 2500–3500	(*3*)
Capsicum sp.	Seeds	Haiti	En Bas Saline	600	(*27*)
Capsicum sp.	Pollen	Venezuela	La Tigra	450–1000	(*28*)

[1]Archaeobiology Program, Department of Anthropology, Smithsonian National Museum of Natural History, Post Office Box 37012, Washington, DC 20013–7012, USA. [2]Department of Archaeology, University of Calgary, 2500 University Drive, NW, Calgary, Alberta, T2N 1N4, Canada. [3]Smithsonian Tropical Research Institute, Apartado Postal 0843–03092, Balboa, Republic of Panama. [4]Department of Anthropology, 107 Swallow Hall, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA. [5]Center for American and World Cultures, 105 MacMillan Hall, Miami University, Oxford, OH 45056, USA. [6]Climate Change Institute, University of Maine, 120 Alumni Hall, Orono, ME 04469–5773, USA. [7]Department of Anthropology, Temple University, 1115 West Berks Street, Philadelphia, PA 19122, USA. [8]Department of Anthropology, South Stevens 5773, University of Maine, Orono, ME 04469–5773, USA. [9]Centro de Antropología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Kilometer 11, Altos de Pipe, Venezuela. [10]Departamento de Arqueología, Etnohistoria y Ecología Cultural, Escuela de Antropología, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad Central de Venezuela, Caracas 1041, Venezuela. [11]Center for Environmental Management of Military Lands, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA.

(leren), manioc, cucurbits (squash), *Canavalia* sp. (jack bean), and the Arecaceae family (palms) has also been recovered from Real Alto (*10–12*). A combination of evidence, including plant remains and site proximity to seasonally flooded bottomland, indicates that agriculture was important in the economies of both Ecuadorian sites. Ecuador is not considered to be the center of domestication for any of the five major economic species of chili peppers. Therefore, the presence of domesticated chilies within this early, complex, agricultural system indicates that these plants must have been domesticated elsewhere earlier than 6000 yr B.P. and brought into the region from either the north or the south.

In central Panama, the Aguadulce Rock Shelter was occupied from about 13,000 to 3200 yr B.P. during both the Preceramic and Early Ceramic periods (*13*). The site has yielded evidence for the cultivation of other plants not native to southern Central America, including maize, manioc, and squashes dating from about 9000 to 5800 yr B.P. We identified chili pepper starch on a groundstone tool recovered from the top of the preceramic deposits; the tool and thus its associated starch residues have a stratigraphic date of about 5600 yr B.P. This artifact also yielded starch grains from maize and domesticated yam (*13*).

The occupation of the coastal shell-midden site of Zapotal coincides with the Early Ceramic period of this region of Panama, beginning about 4800 yr B.P. (*14*). We recovered starches of chilies from groundstone tools, indicating that the peppers were processed and consumed alongside a number of other domesticates at the site, including maize, manioc, and yams (*15*). By this time, swidden cultivation of several domesticated species, including maize and manioc, was well established in the region, and farmers had significantly deforested the foothills near both Panamanian sites (*16*). Thus, the Panamanian record documents the use of domesticated chilies as components of the diet of swidden agriculturists in both Preceramic and Ceramic era groups.

Farther south at 3600 m in the Peruvian Andes lies the site of Waynuna, a Late Preceramic house occupied beginning about 4000 yr B.P. At Waynuna, we found chili starches on processing tools in association with maize, arrowroot, and the remains of what is likely *Solanum* sp. (potato) (*17*). These data indicate that the residents of Waynuna were cultivating maize, tubers, and peppers and were processing them into food on site. Waynuna yielded the only starch assemblage that contained a species-diagnostic morphotype. These chili pepper starches appeared to be derived from *C. pubescens*, the species that includes varieties such as the rocoto pepper, a chili that is cultivated at mid-altitude in the Andes (*2*). When combined with macrofossil evidence (Table 1), the starch data indicate that the cultivation of three domesticated species of chili pepper was contemporaneous on the coast and in the highlands of Peru as early as 4000 yr B.P. in the Late Preceramic period. The presence of numerous other cultivars within the assemblages of each region indicates that sophisticated agriculture was practiced in both regions before the introduction of pottery.

We also found starches of chili peppers at the Three Dog site located on San Salvador Island in the Bahamas. This site was occupied by a group of fisher-horticulturists about 1000 yr B.P. Representing the material remains of at least one household, the site consists of a midden, two activity areas, and a low-density (well-swept) area. Fifty-eight chert microliths, all typical of the morphology commonly described as manioc grater flakes (*18–20*), have been recovered, as were ceramic griddle sherds. The microliths yielded the starchy remains of both maize and unidentified roots or tubers. We recovered chili starches from two flakes that also contained starches of maize.

Lastly, we recovered microfossil evidence for chili pepper at Los Mangos del Parguaza in Venezuela, a large habitation site occupied about

Fig. 1. Archaeological sites mentioned in the text. Red sites yielded starch grains of chili pepper. Blue sites yielded all other classes of remains of chili pepper.

Table 2. Summary of Neotropical archaeological starches of *Capsicum*. F, flaked tool; G, groundstone tool; C, ceramic sherd; S, sediment sample.

Sample	#	Size (μm)	Source	Date in yr B.P. (Ref.)
		Los Mangos, Venezuela (Arauquinoid, Valloid)		
Lev 1, 1	1	15	G	~500–1000 (*21*)
Lev 2, 1	1	17	F	~500–1000 (*21*)
Lev 3, 1	1	15	F	~500–1000 (*21*)
Lev 3, 2	1	22	F	~500–1000 (*21*)
Lev 5, 2	2	19, 20	F	~500–1000 (*21*)
Lev 7, 1	2	20, 20	F	~500–1000 (*21*)
		Three Dog, Bahamas (Lucayan)		
Z87-89	1	19	F	969–1265 Cal* (*29*)
Z1032-1035	1	21	F	969–1265 Cal* (*29*)
		Waynuna, Peru (Preceramic)		
Tool 10	2	18,24	F	3564–3837 Cal† (*17*)
Tool 11	6	14–34	G	3564–3837 Cal† (*17*)
Tool 29	2	24,25	G	3564–3837 Cal† (*17*)
Tool 30	6	19–28	G	3564–3837 Cal† (*17*)
Cat 36	1	18	S	3689–3969 Cal† (*17*)
		Zapotal, Panama (Early Ceramic)		
C2N8F4	4	20-28	G	3560–4850 Cal‡ (*14*)
C7N2	1	25	G	3560–4850 Cal‡ (*14*)
C32N7	1	32.5	G	3560–4850 Cal‡ (*14*)
		Real Alto, Ecuador (Valdivia 3)		
Structure 1	1	20	G	4400–4800 Cal† (*9*)
Structure 1	3	24–26	G	4400–4800 Cal† (*9*)
Structure 10	3	18–24	G	4400–4800 Cal† (*9*)
Structure 10	1	24	G	4400–4800 Cal† (*9*)
		Aguadulce, Panama (Late Preceramic)		
350	3	24–28	G	5600 Cal (*30*)
		Loma Alta, Ecuador (Early Formative)		
SS275	5	22–26	G	5050–6250 Cal† (*9*)
SS275-2	6	16–24	G	5050–6250 Cal† (*9*)
SS292	2	19, 20	G	4550–6050 Cal† (*9*)
Sample 13	2	24, 28	C	4830–5280 Cal† (*9*)
Sample 7	1	27	C	4080–4410 Cal† (*9*)
Level 12	2	24, 28	S	4990–5310 Cal† (*9*)
Sample 11	1	18	C	4250–4860 Cal† (*9*)
Sample 10	1	22	C	4990–5310 Cal† (*9*)
Level 14	2	24, 24	S	4990–5310 Cal† (*9*)
Sample 9	1	28	C	4990–5310 Cal† (*9*)

*Standard and AMS radiocarbon dates from associated charcoal, 2σ calibrated result. †Standard radiocarbon date from associated charcoal, 2σ calibrated result. ‡Standard radiocarbon dates from associated shell, adjusted for 12C/13C ratio, 2σ calibrated results.

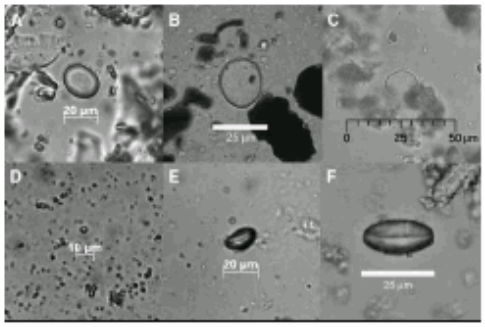


Fig. 2. Modern and archaeological starch granules from *Capsicum*. (**A**) Starch granule from the fruit of modern *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (aji mirasol) showing typical morphology. Note the rounded lenticular form and large, flat, central depression. (**B**) Archaeological *Capsicum* starch granule from Loma Alta. (**C**) Archaeological starch granule of *Capsicum* from Real Alto. (**D**) Starch granule from a modern specimen of *Capsicum annuum* var. *minimum*. This starch granule is typical of those from wild peppers. (**E**) Side view of a modern starch granule from *Capsicum baccatum*. Note the linear figure. (**F**) Side view of an archaeological starch granule of *Capsicum* from Zapotal.

500 to 1000 yr B.P. (*21*). Several large, deep stone metates were scattered over the surface of the site. Excavation of a midden deposit yielded ceramic griddle sherds and microlithic flakes that are often associated with manioc processing (*22*). As at the Three Dog site, the remains of manioc are conspicuously absent from an excavation that yielded artifacts usually associated with manioc processing (*22*). The same processing tools that contained starches of chili pepper also contained remains of maize. Root crops, including arrowroot, *Myrosma* sp. (guapo), and a member of the Zingiberaceae family (ginger) also left their starchy remains. When combined with the data from the Three Dog site, the chili pepper microfossils from Los Mangos del Parguaza support the notion that a sophisticated mixed subsistence economy of both root and seed crops occurred at these sites that were initially categorized as being occupied by manioc horticulturists (*23*).

Neither microfossils typical of wild species nor transitional forms of *Capsicum* were recovered from any site. The presence of domesticated plants used as condiments rather than as staple foods during the Preceramic period indicates that sophisticated agriculture and complex cuisines arose early throughout the Americas and that the exploitation of maize, root crops, and chili peppers spread before the introduction of pottery. Evidence from both macrobotanical and microbotanical remains indicates that once chili peppers became incorporated into the diet, they persisted. Apart from the chili peppers, maize is present at every site we sampled. Maize and chilies occur together from the onset of this record until European contact and, thus, represent an ancient Neotropical plant food complex.

References and Notes

1. C. B. Heiser Jr., in *Evolution of Crop Plants*, N. W. Simmonds, Ed. (Longman, London, 1976), pp. 265–268.
2. W. H. Eshbaugh, in *New Crops*, J. Janick, J. E. Simon, Eds. (Wiley, New York, 1993), pp. 132–139.
3. B. Pickersgill, in *Pre-Columbian Plant Migration*, D. Stone, Ed. (Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1984), pp. 105–123.
4. B. Pickersgill, *Biol. Zent.* **107**, 381 (1988).
5. L. Bohs, R. G. Olmstead, *Syst. Bot.* **22**, 5 (1997).
6. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
7. J. S. Raymond, in *Pacific Latin America in Prehistory: The Evolution of Archaic and Formative Cultures*, M. Blake, Ed. (Washington State Univ. Press, Pullman, 1999), pp. 149–159.
8. D. Lathrap, J. G. Marcos, J. A. Zeidler, *Archaeology* **30**, 2 (1977).
9. J. A. Zeidler, in *Archaeology of Formative Ecuador*, J. S. Raymond, R. Burger, Eds. (Dumbarton Oaks, Washington, DC, 2003), pp. 487–527.
10. D. M. Pearsall, K. Chandler-Ezell, J. A. Zeidler, *J. Archaeol. Sci.* **31**, 423 (2004).
11. D. M. Pearsall, in *Archaeology of Formative Ecuador*, J. S. Raymond, R. Burger, Eds. (Dumbarton Oaks, Washington, DC, 2003), pp. 213–257.
12. K. Chandler Ezell, D. M. Pearsall, J. A. Zeidler, *Econ. Bot.* **60**, 103 (2006).
13. D. R. Piperno, A. J. Ranere, I. Holst, P. K. Hansell, *Nature* **407**, 894 (2000).
14. R. G. Cooke, A. J. Ranere, *World Archaeol.* **24**, 114 (1992).
15. R. Dickau, thesis, Temple University, Philadelphia, PA (2005).
16. D. R. Piperno, D. M. Pearsall, *The Origins of Agriculture in the Lowland Neotropics* (Academic Press, San Diego, CA, 1998).
17. L. Perry *et al.*, *Nature* **440**, 76 (2006).
18. M. J. Berman, A. K. Sievert, T. Whyte, *Lat. Am. Antiq.* **10**, 415 (1999).
19. M. J. Berman, D. M. Pearsall, *Lat. Am. Antiq.* **11**, 219 (2000).
20. W. R. DeBoer, *Am. Antiq.* **40**, 419 (1975).
21. K. Tarble, thesis, University of Chicago, Chicago, IL (2006).
22. L. Perry, *J. Archaeol. Sci.* **31**, 1069 (2004).
23. L. Perry, *Latin Am. Antiq.* **16**, 409 (2005).
24. C. E. Smith, in *Prehistory of the Tehuacan Valley*, D. S. Byers, Ed. (Texas Univ. Press, Austin, 1967), pp. 220–255.
25. D. L. Lentz, M. P. Beaudry-Corbett, M. L. R. del Aguilar, L. Kaplan, *Lat. Am. Antiq.* **7**, 247 (1996).
26. B. Pickersgill, *Am. Antiq.* **34**, 54 (1969).
27. L. A. Newsom, E. S. Wing, *On Land and Sea: Native American Uses of Biological Resources in the West Indies* (Univ. of Alabama, Tuscaloosa, 2004).
28. C. S. Spencer, E. M. Redmond, M. Rinaldi, *Lat. Am. Antiq.* **5**, 119 (1994).
29. M. J. Berman, P. Grivodel, *World Archaeol.* **26**, 421 (1995).
30. A. J. Ranere, R. G. Cooke, in *Paths to Central American Prehistory*, F. W. Lange, Ed. (Univ. Press of Colorado, Niwot, 1996), pp. 49–77.

31. Comparative materials were supplied by the U.S. National Herbarium, E. Perry, J. Perry, and I. Shimada. B. Smith provided comments on the manuscript. Funding for archaeological excavations and starch grain studies was provided by the American Philosophical Society, the Concejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, the Escuela Superior Politecnica del Litoral, the Foundation for Exploration and Research on Cultural Origins, the Heinz Charitable Trust Latin American Archaeology Program, NSF, the Office of the Provost at Ithaca College, the Programa de Antropología para el Ecuador, the Smithsonian National Museum of Natural History, the Smithsonian Tropical Research Institute, the Social Sciences and Humanities Council of Canada, Temple University, the University of Missouri Research Board, and Werner-Gren.

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/315/5814/986/DC1
Materials and Methods
SOM Text
Fig. S1
Tables S1 and S2
References

30 October 2006; accepted 21 December 2006
10.1126/science.1136914

Multipotent *Drosophila* Intestinal Stem Cells Specify Daughter Cell Fates by Differential Notch Signaling

Benjamin Ohlstein and Allan Spradling*

The adult *Drosophila* midgut contains multipotent intestinal stem cells (ISCs) scattered along its basement membrane that have been shown by lineage analysis to generate both enterocytes and enteroendocrine cells. ISCs containing high levels of cytoplasmic Delta-rich vesicles activate the canonical Notch pathway and down-regulate Delta within their daughters, a process that programs these daughters to become enterocytes. ISCs that express little vesiculate Delta, or are genetically impaired in Notch signaling, specify their daughters to become enteroendocrine cells. Thus, ISCs control daughter cell fate by modulating Notch signaling over time. Our studies suggest that ISCs actively coordinate cell production with local tissue requirements by this mechanism.

Stem cells in adult tissues frequently reside in specific anatomical positions known as niches, whose microenvironment represses premature differentiation and controls proliferation (*1*, *2*). Several different signal transduction pathways—including BMP (bone morphogenetic protein), JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), Wnt, and

Anexo 2. Hoja de datos por especie para recolección

HOJA DE DATOS POR ESPECIE

(Yánez, com. pers.)

Familia:_____

Género y especie: _____ **Autor:** _____

Sitio de Colección:_____

Habito de la planta: Hierba:____ Arbusto:____ Árbol:____

Epífita:____ Parasita:____ Bejuco:____

Abundancia de la especie: Alta:____ Moderada:____ Baja:____

Hábitat: Bosque natural:____ Paramo:____ Bosque artificial:____

Monocultivo comercial:____ Policultivo comercial:____

Jardín:____ Otro:____

Características del manejo de la especie:_____

Nombre común 1:_____ **Traducción:** _____

Nombre común 2:_____

Traducción:_____

Colector(es):_____

Informante:

_____

Características de uso:_____

Breve descripción de la preparación y uso:

_____

_____

Anexo 3. Certificado de identificación de especies

MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES

MECN

CERTIFICADO

Quito, 02 de julio del 2013

El Herbario Nacional (QCNE), Sección Botánica del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN), certifica que, **Lorena Anabel Rivadeneira Herrera** con **C.I.: 1717679540** y **Diana Aurelia Balseca Álvarez** con **C.I.: 1715366868**, estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, de la Universidad Politécnica Salesiana, realizaron la revisión e identificación taxonómica de varios especímenes vegetales del género *Capsicum* spp., mediante la comparación con las colecciones botánicas del Herbario Nacional y la asistencia técnica de la Dra. Diana Fernández. Las muestras corresponden al proyecto de tesis titulada: "Extracción y Cuantificación de Capsaicina a partir de cinco especies nativas del género *Capsicum* existentes en el Ecuador mediante cromatografía líquida de alta eficiencia".

Las señoritas Rivadeneira y Balseca trabajaron en el Herbario Nacional del 22 al 29 de noviembre del año 2012, en horario de 08h00 a 16h30.

Es todo cuanto podemos certificar en honor a la verdad, pudiendo las interesadas hacer uso de este documento como estimen conveniente.

Atentamente

Dra. Diana Fernández F.
CURADORA PRINCIAPAL
HERBARIO NACIONAL (QCNE)

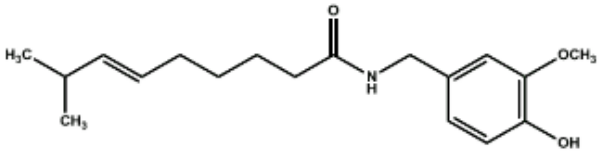
QCNE
MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES
Rumipamba N° 341 y Av. De los Shyris, Parque La Carolina • Quito-Ecuador • Casilla Postal; 07-07-8976
Teléfonos (593-2) 2449 825 / 2449 824 • E-mail: info@mecn.gov.ec • www.mecn.gov.ec

Anexo 4. Certificado de pureza Capsaicina USP

U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality

USP Certificate

Capsaicin
LOT I0L046



Molecular Formula
$C_{18}H_{27}NO_3$

Molecular Weight
305.41

CAS Number
404-86-4

LABEL TEXT

USP REFERENCE STANDARD

CAPSAICIN 100 mg

DANGER! Toxic if swallowed. Causes skin and serious eye irritation. May cause respiratory irritation and an allergic skin reaction

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.941 mg of capsaicin per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light and moisture. Store in a refrigerator.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT. NO. 1091108

LOT: I0L046

Quality Assurance

Page 1 of 2 10-Sep-12

Calculation Value

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in the compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABLE QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2012 The United States Pharmacopeial Convention. All rights reserved.

Anexo 5. Método oficial AOAC

AOAC Official Method 995.03
Capsaicinoids in Capsicums and Their Extractives

Liquid Chromatographic Method

First Action 1995

[Applicable for determination of 750–650000 Scoville Heat Units (SHU) of capsaicinoids in ground and crushed red pepper, chili pepper, ground cayenne pepper, ground jalapeno pepper, and red pepper oleoresins. Not applicable to chili powders or products containing oregano or thyme.]

(Caution: See Appendix B, safety notes for the safe handling of organic solvents and special chemical hazards–acetone, acetonitrile, and ethanol. See Material Safety Data Sheets, or equivalent, for each reagent. N-Vanillyl-n-nonanamide is an extreme irritant; do not inhale. Dispose of waste solvents in an appropriate manner compatible with applicable environmental rules and regulations.)

Method Performance:

See Table 995.03 for method performance data.

A. Principle

Test sample is extracted in warm ethanol using reflux condenser. Extract is filtered and injected into liquid chromatograph equipped with UV or fluorescence detector.

B. Apparatus

(a) Liquid chromatograph (LC). Equipped with 1 V integrator, 20 µL sample injector, and with UV detector set at 280 nm wavelength or fluorometer with excitation 280 nm and emission 325 nm. Operating conditions: temperature, ambient (20–25°C); flow rate, 1.5 mL/min., isocratic; relative retention times: N-vanillyl-n-nonanamide, 1.00; nordihydrocapsaicin, 0.90; capsaicin, 1.00; dihydrocapsaicin, 1.58. See Figure 995.03 for baseline separation of major capsaicinoids.

(b) LC column. Stainless, C18, 150 × 4.6 mm i.d. packed with 5 µm particle size. Use guard column, if desired.

(c) Reflux condenser.

(d) Syringe filter. 0.45 µm.

(e) C18 solid-phase extraction cartridge.

C. Reagents

(a) Ethanol. 95% or denatured, suitable for chromatography.

(b) Acetone. ACS grade.

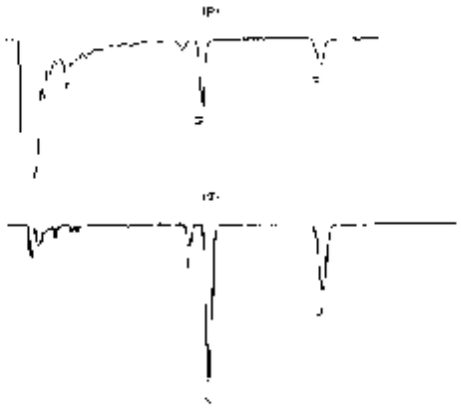


Figure 995.03—Red pepper extract analyzed by (a) fluorescence detection, and (b) UV detection. Peak 1 = nordihydrocapaicin; peak 2 = capsaicin; peak 3 = dihydrocapsaicin

(c) LC mobile phase. Acetonitrile-water. Use LC grade solvents, or equivalent. Mix 400 mL acetonitrile with 600 mL H_2O containing 1% acetic acid (v/v). De-gas with helium or by other suitable technique.

(d) N-Vanillyl-n-nonanamide standard solutions. N-Vanillyl-*n-nonanamide standard, 99%, is available as synthetic capsaicin from Penta International Corp., 50 Okner Pkwy, Livingston, NJ 07039. Keep solutions out of direct sunlight. (1) Standard solution A—0.15 mg/mL. Accurately weigh 75 mg N-vanillyl-n-nonanamide and transfer it into 500 mL volumetric flask. Dilute to volume with ethanol, and mix. Use standard solution A for analyzing all peppers except chili pepper. (2) Standard solution B—0.015 mg/mL. Transfer 10 mL standard solution A into 100 mL volumetric flask, dilute to volume with ethanol, and mix. Use standard solution B when analyzing chili peppers.*

D. Extraction

(a) Ground or crushed peppers. Accurately weigh ca 25 g pepper into 500 mL boiling flask. Place 200 mL ethanol into same flask, add several glass beads, and attach flask to reflux condenser. Gently reflux test sample 5 h and then allow to cool. Filter 1–4 mL

Table 995.03 Method Performance for Determination of Capsaicinoids in Capsicums and Their Extractives by Liquid Chromatography (SHU)

Sample	Mean	N[a]	s_r	s_R	RSD_r, %	RSD_R, %	r^b	R^b
Chili pepper	900-2700	9	40-90	130-230	[illegible]	6.6-11.6	110-220	280-620
Red pepper	30140-41630	11	270-540	1600-1860	[illegible]	4.6-5.2	720-2350	4480-5210
Red pepper oleoresins	305630-844760	13	[illegible]	[illegible]	2.2-4.3	7.6-14.8	[illegible]	[illegible]

[a] N = No. of laboratories

[b] $r = 2.8 \times s_r$

© 1997 AOAC INTERNATIONAL

sample through 0.45 μm syringe filter into small glass vial. Use for LC analysis.

(b) Red pepper oleoresins. Accurately weigh 1–2 g oleoresin into 50 mL volumetric flask. Increase weight of sample, if total capsaicinoid concentration is <1%.

Note: Do not allow any oleoresin to coat sides of flask.

Add 5 mL acetone, C(b), to flask and swirl contents of flask until test sample is completely dispersed (no oleoresin can coat bottom of flask when turning flask neck at 45° angle). Add five 3–5 mL portions ethanol, swirling flask during each addition. Dilute contents of flask to volume with ethanol and mix well.

Hold C18 solid-phase extraction cartridge over 25 mL volumetric flask or place cartridge on 10 mL glass syringe and hold over 25 mL volumetric flask. Transfer 5 mL solution from flask to cartridge or syringe. (Note: When using syringe, deliver solution to bottom of syringe so that sides of syringe are not coated with sample.) Pass aliquot through cartridge and collect in 25 mL flask. Wash cartridge 3 times with 5 mL ethanol, collecting washings in same flask. Dilute contents of flask to volume with ethanol and mix. Filter 1–4 mL solution through 0.45 μm syringe filter into small glass vial. Use for LC analysis.

E. LC Determination

Inject 20 μL standard solution B, C(d)(2), onto LC column, when analyzing chili peppers. When analyzing other matrices inject 20 μL standard solution A, C(d)(1). Re-inject standard solution at intervals of 6 sample injections, or less.

Inject in duplicate 20 μL test sample from D onto LC column.

After ≥30 sample injections, purge LC column 30 min with 100% acetonitrile at 1.5 mL/min flow rate. Use LC mobile phase, C(c), for further analysis.

F. Calculation

Capsaicinoids contain 3 major compounds: nordihydrocapsaicin (N), capsaicin (C), and dihydrocapsaicin (D). Calculate capsaicinoids as sum of these compounds [N + C + D; in Scoville Heat Units (SHU); 1 μg total capsaicinoids/g = ca 15 SHU], as follows:

(a) UV detection

(1) Ground peppers and chili pepper:

$$N = (PN/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.98) \times 9300$$

$$C = (PC/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.89) \times 16100$$

$$D = (PD/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.93) \times 16100$$

where PN, PC, and PD = average peak areas for nordihydrocapsaicin, capsaicin, and dihydrocapsaicin, respectively, from duplicate injections; PS = average peak area of appropriate standard solution; CS = concentration of standard solution, mg/mL; WT = weight of test sample, g.

(2) Red pepper oleoresins:

$$N = (PN/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.98) \times 9300$$

$$C = (PC/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.89) \times 16100$$

$$D = (PD/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.93) \times 16100$$

(b) Fluorescence detection

(1) Ground peppers and chili pepper:

$$N = (PN/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.92) \times 9300$$

$$C = (PC/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.88) \times 16100$$

$$D = (PD/PS) \times (CS/WT) \times (200/0.93) \times 16100$$

(2) Red pepper oleoresins:

$$N = (PN/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.92) \times 9300$$

$$C = (PC/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.88) \times 16100$$

$$D = (PD/PS) \times (CS/WT) \times (250/0.93) \times 16100$$

Reference: J. AOAC Int. 79, 738(1996)

© 1997 AOAC INTERNATIONAL

Anexo 6. Descriptores morfológicos utilizados para la caracterización de las especies de *Capsicum* sp.

	DESCRIPTORES	**DETALLES**
D1	Altura de la planta	Medido en centímetros
D2	Semillas por fruto	-
D3	Peso del fruto	Gramos
D4	Frutos por nudo	-
D5	Fructificación	Días
D6	Longitud del fruto	Medido en centímetros
D7	Diámetro del fruto	Medido en centímetros
D8	Pétalos por flor	-
D9	Sépalos por flor	-
D10	Flores por brazo	-
D11	Frutos por brazo	-
D12	Hoja madura ancho	Medido en centímetros
D13	Hoja madura largo	Medido en centímetros
D14	Longitud del pedúnculo	Medido en centímetros
D15	Tamaño de la corola	Medido en centímetros
D16	Habito de la planta	**1.** Postrada: Su ramificación es acamada **2.** Intermedia: Su ramificación es semiacamada. **3.** Erecto: Su ramificación es erecta y no se acama fácilmente.
D17	Color de las semillas	1. Crema 2. Amarilla 3. Morada
D18	Forma de las semillas	1. Arriñonada 2. Denticulada 3. Excéntrica 4. Ovoide alargada 5. Alongada 6. Otra
D19	Color del fruto en estado maduro	1. Amarillo limón 2. Amarillo 3. Amarillo naranja 4. Naranja pálido 5. Naranja-Rojo 6. Rojo claro 7. Rojo obscuro- vino 8. Rojo brillante 9. Morado 10. Marrón
D20	Forma del fruto	1. Elongado 2. Casi redondo 3. Triangular 4. Acampanado 5. Acorazonado 6. Cónico
D21	Forma de la base del fruto	1. Truncado 2. Redondo-obtuso 3. Prolongado 4. Otros
D22	Forma del ápice del fruto	1. Redondeada 2. Aguda

		3. Acuminada
D23	Forma del fruto (corte transversal)	1. Pentágona 2. Redonda 3. Lobada 4. Lobada suave 5. Lobada fuerte
D24	Forma del fruto (corte longitudinal)	1. Elíptica alargada 2. Oblanceolada 3. Lanceolada 4. Oblonga pentágona 5. Elíptica 6. Obovado 7. Ovado 8. Otros
D25	Aroma del fruto	1. Sin aroma 2. Aroma Suave 3. Fuerte 4. Aroma fuerte acre
D26	Textura de la piel del fruto	1. Liso 2. Semirugoso 3. rugoso
D27	Uniformidad del fruto	1. Uniforme 2. No uniforme
D28	Factibilidad para separar el fruto del sépalo	4. Fácil desprendimiento. 5. Medio 6. Difícil.
D29	Firmeza del fruto	1. Suave 2. Intermedio 3. Duro
D30	Densidad arbustiva	1. Densa 2. Semidensa 3. Rala
D31	Forma de la corola	1. Estrellada 2. Semiestrellada 3. Pentagonal 4. Rotada 5. Muy rotada
D32	Forma de los pétalos	1. Lanceolado 2. Obovada 3. Ovado 4. Elíptico
D33	Color de las anteras	1. Amarilla 2. Morada
D34	Forma del ápice de los pétalos	1. Acuminado 2. Agudo 3. Apiculado 4. Obtuso 5. Otro
D35	Pubescencia de la flor	1. Ausencia 2. Presencia
D36	Color del cáliz	1. Café claro 2. Café 3. Verde

		4. Verde amarillento
D37	Manchas en la corola	1. Amarillo 2. Morado 3. Ausente
D38	Color primario de la corola	1. Amarillo 2. Blanca amarillo 3. Blanca 4. Blanca verdosa 5. Verde claro 6. Verde amarillento 7. Morado
D39	Forma del peciolo	1. Cilíndrico 2. Aplanado 3. Otros
D40	Tipo de hoja	1. Simple 2. Compuesta 3. Ambos estados
D41	Forma de la lámina foliar	1. Cordada 2. Elíptica 3. Ovalada 4. Lanceolada 5. Oval-lanceolada 6. Otros
D42	Forma basal de las hojas	1. Cordada 2. Subcordada 3. Redonda 4. Hendida 5. Otros
D43	Forma del margen de la hoja	1. Enteras 2. Ondulada 3. Sinuado 4. Otros
D44	Forma del ápice de la hoja	1. Acuminado 2. Agudo 3. Apiculado 4. Obtuso 5. Otros
D45	Color de las nervaduras en el haz de las hojas	1. Amarillo 2. Púrpura 3. Púrpura claro 4. Púrpura grisáceo 5. Púrpura oscuro 6. Verde amarillento 7. Naranja grisáceo

Elaborado por: Diana Balseca y Lorena Rivadeneira

Anexo 7. Análisis de Varianza y prueba De Tukey mediante el programa *ESTADISTIX 8.0*

ESTADISTIX 8.0

One-Way AOV for: Annuum, Baccatum, Chinense, Frutescens, Pubescens

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between	4	6.985E+08	1.746E+08	1054	0.0000
Within	40	6630381	165760		
Total	44	7.052E+08			

Grand Mean 3628.8 CV 11.22

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	39.5	4	0.0000
Cochran's Q	0.6079		
Largest Var / Smallest Var	233.49		

Component of variance for between groups 1.939E+07
Effective cell size 9.0

Variable	**Mean**
Annuum	2992
Baccatum	1165
Chinense	11340
Frutescens	2047
Pubescens	600

Observations per Mean 9
Standard Error of a Mean 135.71
Std Error (Diff of 2 Means) 191.93

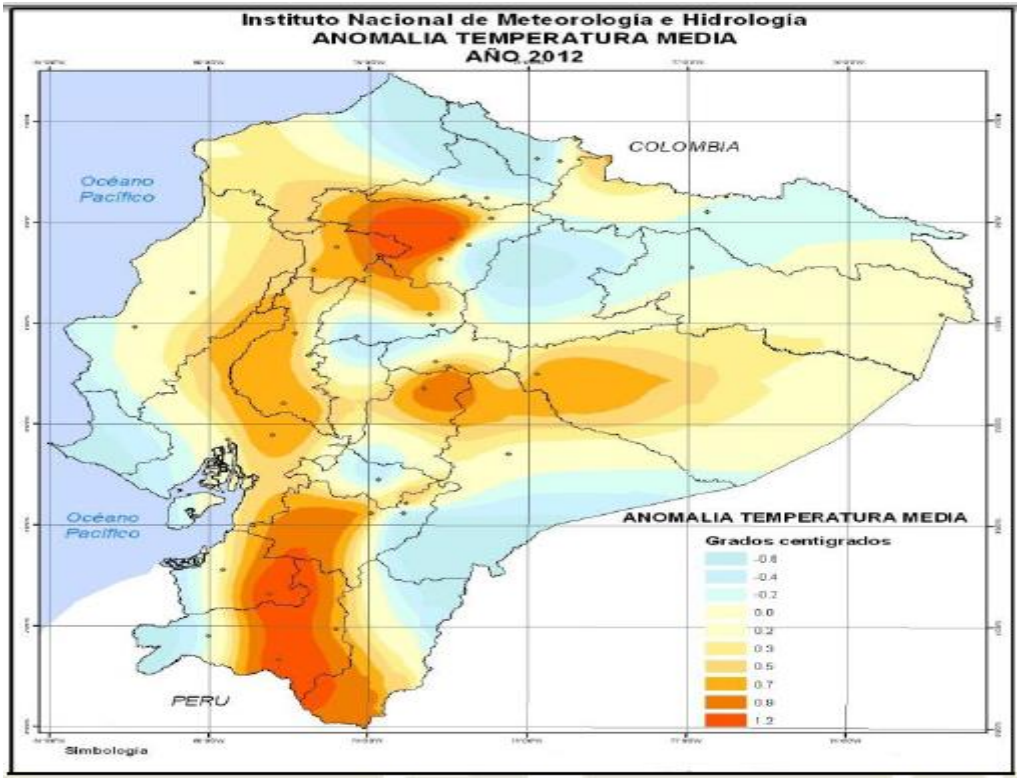
Statistix 8.0 06/06/2013, 0:42:58

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	**Mean**	**Homogeneous Groups**
Chinense	11340	A
Annuum	2992.0	B
Frutescen	2046.8	C
Baccatum	1164.8	D
Pubescens	600.22	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 191.93
Critical Q Value 4.040 Critical Value for Comparison 548.25
All 5 means are significantly different from one another.

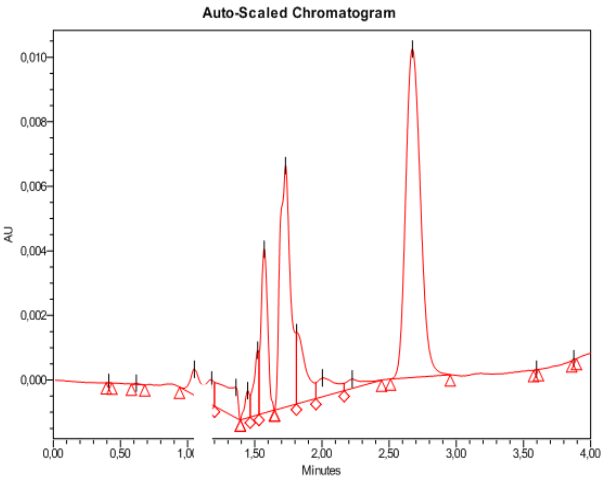
Anexo 8. Temperaturas medias en el Ecuador.



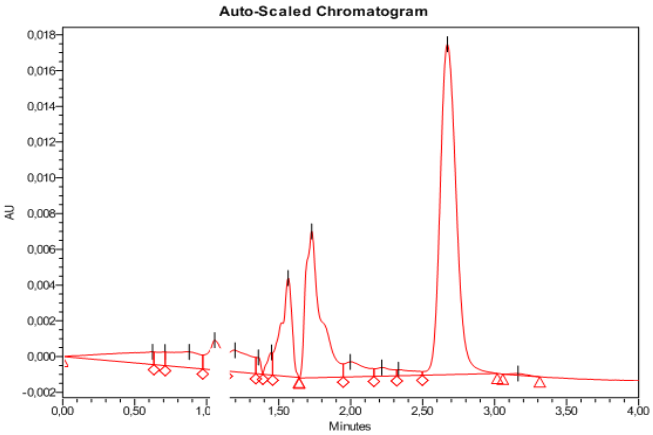
	INAMHI T EMPERATURA (ºC)														
	Loja			S. Domingo			Esmeraldas			Los Ríos			Oriente		
M	Max	Med	Min	Max	Med	Mín.	Max	Med	Mín.	Max	Med	Mín.	Max	Med	Mín.
Ene	24.0	16.7	7.4	29.9	24.9	17.5	29.7	27.7	25.7	34.2	25.9	17.9	30.7	22.0	19.0
Feb.	23.0	16.0	8.3	29.0	23.4	18.5	30.2	27.3	24.3	34.0	27.3	20.1	34.6	26.6	18.3
Mar	21.8	17.0	7.5	27.8	25.3	18.0	30.3	28.5	26.6	34.3	25.1	19.0	31.2	25.4	15.5
Abr.	24.5	16.4	7.3.	28.0	21.2	18.7	31.5	28.7	25.5	33.9	26.3	21.3	30.2	25.0	17.5
Muy	23.2	16.1	7.7	29.8	25.4	17.9	32.5	29.3	26.0	32.8	22.7	15.9	30.9	21.7	16.9
Jun.	24.5	15.6	8.4	29.7	24.1	18.3	29.8	27.2	24.6	31.4	24.9	17.9	28.2	24.2	15.4
Jul.	22.4	15.9	8.0	29.8	23.8	17.8	28.7	27.8	26.8	33.2	25.5	16.5	33.0	24.3	18.0
Ago.	23.9	16.9	4.4	29.5	23.6	18.4	29.3	27.1	24.9	32.6	24.6	18.7	31.1	23.0	17.9
Sep.	24.8	17.0	6.6	29.3	23.5	17.5	28.5	27.9	27.3	28.7	24.8	20.0	34.5	26.7	18.0
Oct.	23.5	16.2	7.6	29.9	23.2	18.2	29.8	27.6	25.3	34.2	24.2	18.6	32.2	22.3	14.1
Nov.	22.6	15.8	7.2	29.2	22.8	17.7	29.5	27.6	25.7	33.6	24.0	20.0	30.5	23.0	15.8
Dic.	24.4	15.9	7.2	29.1	23.3	18.0	30.1	28.5	26.9	33.4	24.5	20.5	34.1	21.4	19.6

Anexo 9. Cromatogramas obtenidos de la cuantificación de Capsaicina

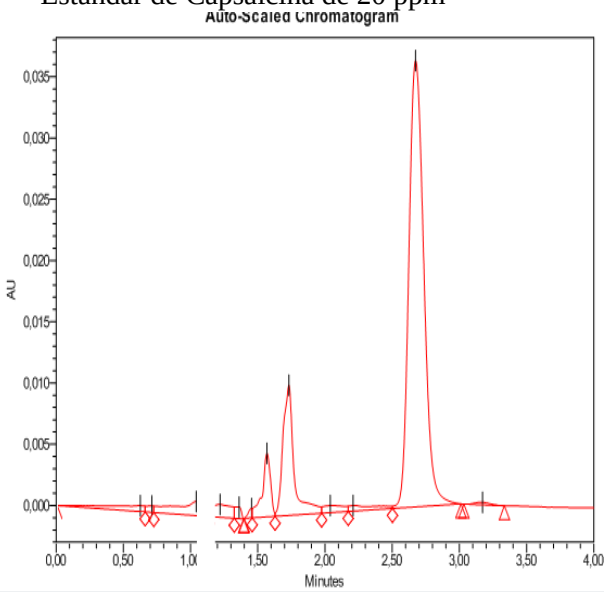
Estándar de Capsaicina de 5ppm



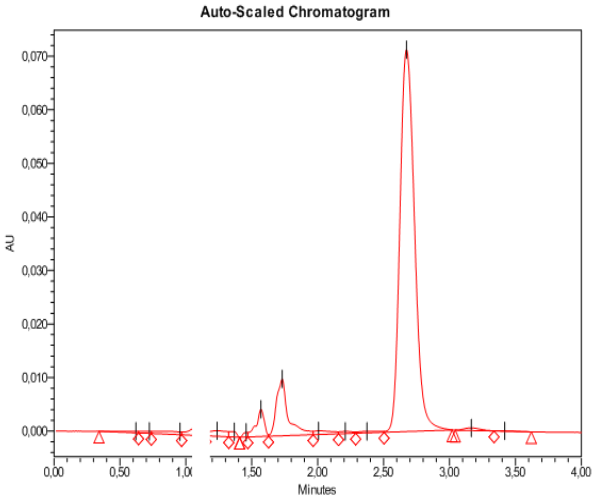
Estándar de Capsaicina de 10ppm



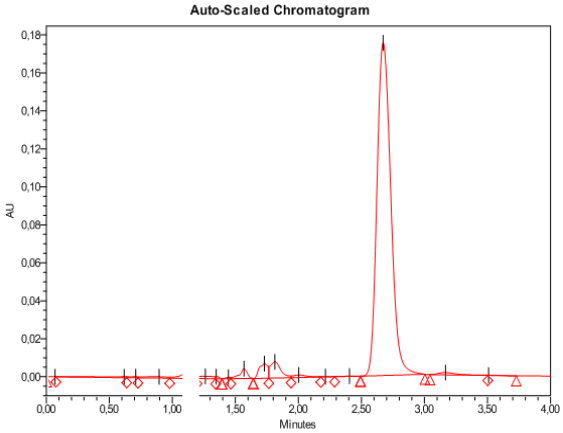
Estándar de Capsaicina de 20 ppm



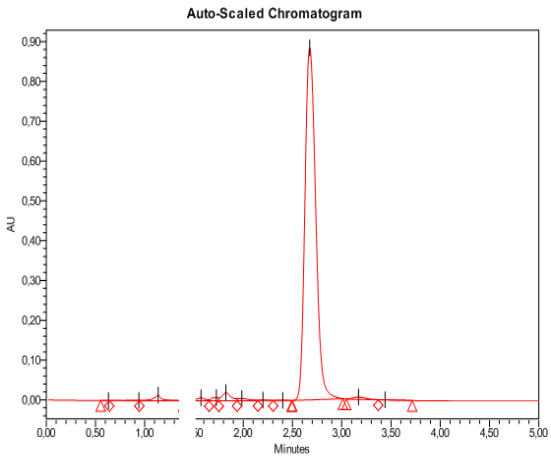
Estándar de Capsaicina de 40 ppm



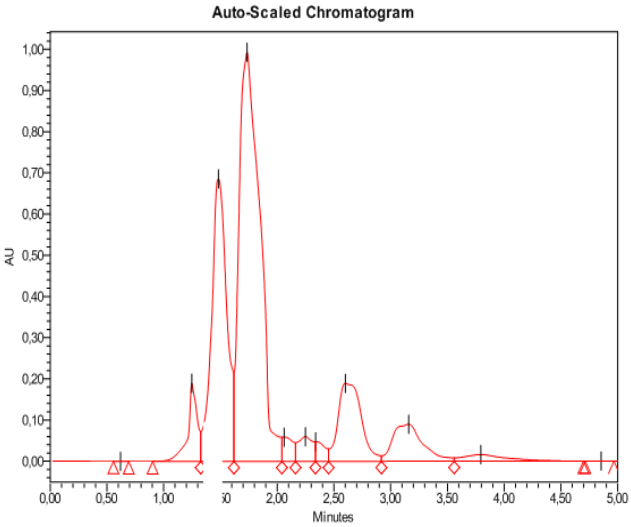
Estándar de Capsaicina 100 ppm



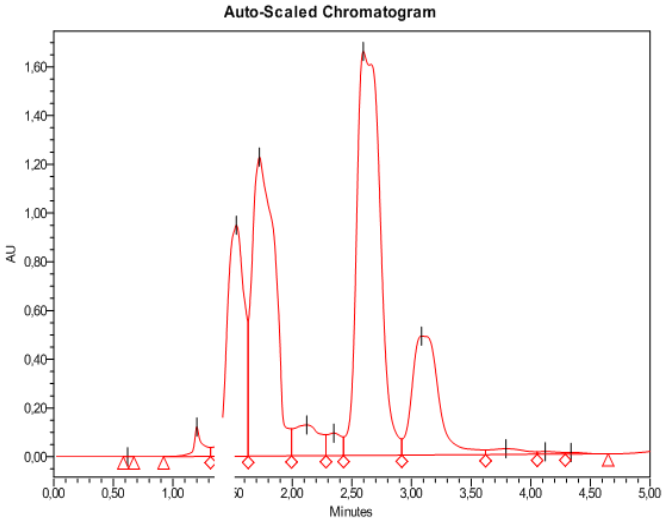
Estándar de Capsaicina de 500 ppm



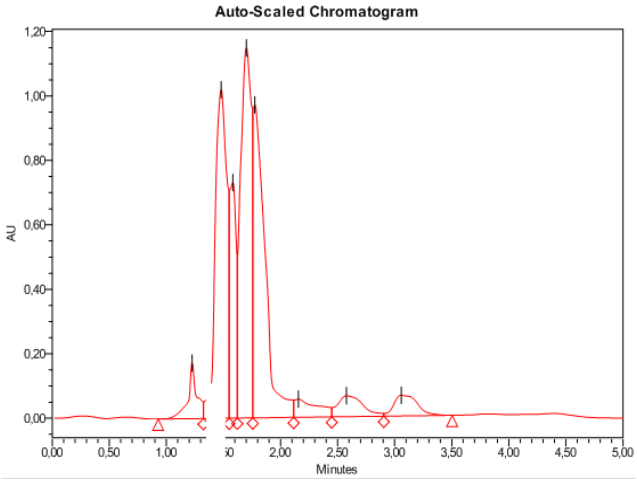
C. baccatum



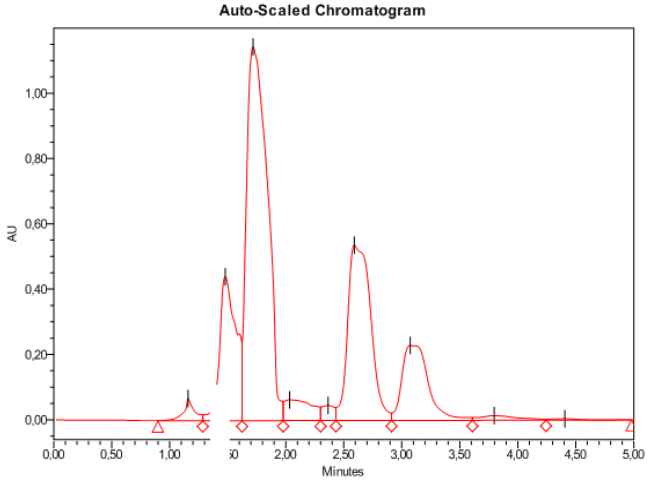
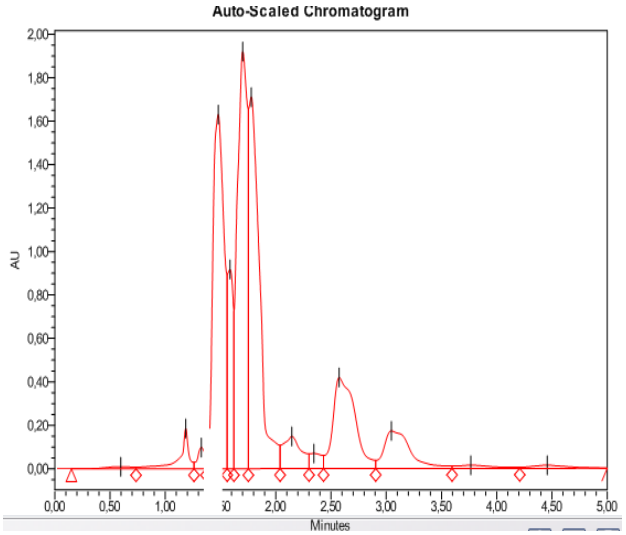
C. chinense



C. pubescens



C. annuum



C. frutescens