

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE METABOLITOS CARACTERÍSTICOS Y POLIFENOLES DE
LAS ESPECIES *CAPSICUM ANNUUM* Y *PIPER NIGRUM*, CULTIVADAS
EN COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración del Programa de Estudios de Posgrado en
Química para optar al grado y título de Maestría Académica en Química

LUIS FELIPE VARGAS HUERTAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Jacqueline, compañera indiscutible en todo este camino, dándome ánimos e inspirándome para continuar cada día. Su amor, ayuda y apoyo representan para mí más de lo que pueda escribir en estas líneas. Esta Tesis es para ti.

A mis padres, quienes me enseñaron el valor del esfuerzo y las recompensas que deja el trabajo bien realizado, para ustedes que lo han dado todo por sus hijos, gracias infinitas.

A mi hermano, porque también fue su sacrificio lo que me permitió llegar hasta este momento.

A la Dra. Mirtha Navarro, quien no solo me abrió la puerta de BIODISS para aprender y crecer, sino que con paciencia también me motivó y orientó cuando lo necesitaba.

A mis compañeras y compañeros en BIODISS, testigos de dichas y tristezas, la ayuda de amigos así nunca será olvidada.

A todos los que con su apoyo de una y otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo, gracias.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Química”

Dr. Juan José Araya Barrantes

**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**

Dra. Mirtha Navarro Hoyos

Directora de Tesis

Dr. Renato Murillo Masís

Asesor

M.Sc. Paola Fuentes Schweizer

Asesora

Dr. Max Chavarría Vargas

**Director
Programa de Posgrado en Química**

Luis Felipe Vargas Huertas

Candidato

Contenidos

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	ii
HOJA DE APROBACIÓN	iii
RESUMEN	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Perfil y propiedades de las capsaicinas en Chile y de las piperamidas en pimienta	2
1.2 Perfil y propiedades de los polifenoles en Chile y pimienta	8
1.3 Situación y relevancia de estudios fitoquímicos de estos dos cultivos en Costa Rica	11
CAPÍTULO II. MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1 Equipo, Materiales y Reactivos	17
2.2 Metodología.....	19
2.2.1 Características y procesamiento de las muestras	19
2.2.2 Proceso de extracción para obtención de amidas.....	21
2.2.3 Caracterización de los extractos de amidas a través de UHPLC-HRMS.....	22
2.2.4 Cuantificación de las amidas por UHPLC-DAD	22
2.2.5 Análisis de perfil de compuestos de pimienta por HPTLC.....	24
2.2.6 Purificación y aislamiento de amidas	25
2.2.7 Proceso de extracción para obtención de polifenoles	26
2.2.8 Caracterización de los extractos de polifenoles a través de UHPLC-HRMS.....	28
2.2.9 Determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	28
2.2.10 Análisis de actividad antioxidante con el método de DPPH	29
2.2.11 Análisis de actividad antioxidante con el método ORAC.....	29
2.2.12 Análisis estadístico.....	30
CAPÍTULO III. RESULTADOS	31
3.1 Extracción de amidas de Chile y pimienta.....	31
3.2 Caracterización de amidas de Chile y pimienta.....	34
3.3 Cuantificación de amidas de Chile y pimienta.....	41
3.4 Perfil de componentes de pimienta por HPTLC	44

3.5 Obtención de piperina	47
3.6 Fraccionamiento del extracto de <i>P. nigrum</i> y aislamiento de la guineensina	49
3.7 Fraccionamiento del extracto de <i>C. annuum</i>	59
3.8 Extracción de polifenoles	67
3.9 Caracterización de polifenoles por UPLC-HRMS	72
3.10 Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu	79
3.11 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH	83
3.12 Determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC.....	84
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	86
4.1 Caracterización HRMS de amidas de <i>C. annuum</i> y <i>P. nigrum</i> costarricenses.....	86
4.2 Contenido de amidas de chile y pimienta.....	97
4.3 Caracterización por HPTLC de compuestos en <i>Piper nigrum</i> costarricense	102
4.4 Obtencion de piperina y de guineensina a partir de <i>P. nigrum</i> costarricense	103
4.5 Fraccionamiento del extracto de <i>C. annuum</i> e identificación por RMN.....	107
4.6 Caracterización HRMS de polifenoles de <i>C. annuum</i> y <i>P. nigrum</i> costarricenses	110
4.7 Contenido de polifenoles y actividad antioxidante	123
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFÍA	131

RESUMEN

El presente trabajo permitió el análisis de chile picante (*Capsicum annuum*) y de pimienta negra (*Piper nigrum*) cultivadas en Costa Rica, a través de diferentes rutas enfocadas en dos tipos de metabolitos secundarios, la primera dirigida a amidas características en estos frutos, los cuales son sustancias de menor polaridad. En la segunda aproximación, el análisis se enfocó en compuestos polifenólicos altamente polares.

En *C. annuum*, el análisis por UHPLC-HRMS permitió la identificación de 12 compuestos, de los cuales se lograron cuantificar las 3 mayoritarias mediante UHPLC-DAD, destacando la capsaicina y la dihidrocapsaicina como mayoritarias. Adicionalmente, con HPLC semipreparativo se logró el aislamiento de dihidrocapsaicina con alta pureza, la cual es de interés como neuroprotector.

Un análisis similar en *P. nigrum* reveló la presencia de 31 amidas, de las cuales se cuantificaron 15 por medio de UHPLC-DAD. Entre estas, la amida mayoritaria, piperina, se aisló mediante cromatografía de columna para su posterior utilización en la producción de materiales orgánicos multicomponentes. Por otro lado, se utilizó HPLC semipreparativo para aislar guineensina, con estudios en el sistema endocanabinoide, con un rendimiento superior al reportado en la literatura.

Complementariamente, se utilizó HPTLC en *P. nigrum*, con el fin de verificar la factibilidad de utilizar esta técnica en la cuantificación de piperina como evaluador de la conformidad en productos comerciales, demostrándose un perfil de composición similar al de las muestras obtenidas en otros países.

Para los extractos polares de las muestras, el análisis por UHPLC-HRMS permitió identificar 14 compuestos polifenólicos en *C. annuum* y también 14 diferentes compuestos en *P. nigrum*. Estos extractos fueron además cuantificados por el método Folin-Ciocalteu, con resultados dentro de lo reportado en la literatura para ambas muestras. La evaluación de su respuesta antioxidante se realizó con las técnicas DPPH y ORAC, obteniendo resultados para *C. annuum* en el rango de la literatura, pero con valores inferiores a los reportados en el caso de *P. nigrum*.

Los análisis realizados permitieron una caracterización cualitativa y cuantitativa detallada de las muestras de *C. annuum* y *P. nigrum* de Costa Rica, lo que constituye el primer estudio en Centroamérica con este nivel de profundidad para dichas plantas.

LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Descripción de las muestras de <i>C. annuum</i> y <i>P. nigrum</i> obtenidas de PROPICA..	20
Cuadro II. Condiciones y resultados de las extracciones de amidas en el diseño factorial de <i>C. annuum</i>	32
Cuadro III. Condiciones y resultados de las extracciones de amidas en el diseño factorial de <i>P. nigrum</i>	34
Cuadro IV. Identificación de amidas en <i>C. annuum</i> por UHPLC-Q-TOF.....	36
Cuadro V. Identificación de amidas en <i>P. nigrum</i> por UHPLC-Q-TOF.....	38
Cuadro VI. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de amidas de <i>C. annuum</i> con respecto a la masa de muestra seca.	41
Cuadro VII. Contenido de capsaicinoides en las muestras de <i>C. annuum</i> . Valores en mg Capsaicina Equivalente/100 g muestra seca.	42
Cuadro VIII. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de amidas de <i>P. nigrum</i>	42
Cuadro IX. Contenido de piperamidas en las muestras de <i>P. nigrum</i> . Valores en mg Piperina Equivalente/100 g muestra seca.....	43
Cuadro X. Cuantificación de piperina en las muestras de <i>P. nigrum</i> , por perfil de pico de imagen a 254 nm, y por densitometría a 331 nm.	47
Cuadro XI. Desplazamientos y asignación de las señales de RMN (CD_3OD) de la piperina aislada.....	49
Cuadro XII. Rendimientos obtenidos en el fraccionamiento semipreparativo del extracto de <i>P. nigrum</i>	50
Cuadro XIII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros 1H y ^{13}C -RMN de la guineensina aislada, en $CDCl_3$	53

Cuadro XIV. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4-octadecadienamida, en CDCl_3	55
Cuadro XV. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,13 <i>Z</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4,13-octadecatrienamida en CDCl_3	58
Cuadro XVI. Rendimiento de las fracciones de <i>C. annuum</i> obtenidas por cromatografía semipreparativa.....	59
Cuadro XVII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de la capsaicina en CDCl_3	62
Cuadro XVIII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de la dihidrocapsaicina en CDCl_3	64
Cuadro XIX. Desplazamientos de las señales de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en CDCl_3 de la homocapsaicina.	66
Cuadro XX. Determinación de Folin-Ciocalteu en muestras de chile con Extracción C-1.	67
Cuadro XXI. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extracciones C-2 y C-3.	68
Cuadro XXII. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extr-C-4.....	68
Cuadro XXIII. Determinación polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extr-C-5.	69
Cuadro XXIV. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en las muestras de pimienta con el método Extr-P-1.	70
Cuadro XXV. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en la muestra Pnien, con los métodos Extr-P-2 a Extr-P-5.....	70
Cuadro XXVI. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Pnien con el método Extr-P-6.	71

Cuadro XXVII. Identificación por UPLC-ESI-MS usando un Orbitrap XL, de polifenoles presentes en chiles costarricenses. La presencia de cada compuesto en las muestras se representa con una equis (x).	73
Cuadro XXVIII. Identificación por UPLC-ESI-MS usando un Orbitrap XL de polifenoles presentes en pimientas costarricenses. La presencia de cada compuesto en las muestras se representa con una equis (x).	77
Cuadro XXIX . Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de polifenoles de <i>C. annuum</i> utilizando el método optimizado Extr-C-5.	79
Cuadro XXX. Valores individuales de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, obtenidos para los extractos polifenólicos Extr-C-5 de las muestras Cahfo y Cahva.	80
Cuadro XXXI. Resumen de los valores de polifenoles totales obtenidos para los extractos polifenólicos de las muestras de <i>C. annuum</i> , mediante el método Folin-Ciocalteu.....	80
Cuadro XXXII. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de polifenoles de <i>P. nigrum</i> utilizando el método optimizado Extr-P-6.	81
Cuadro XXXIII. Valores individuales de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, obtenidos para los extractos polifenólicos Extr-P-6 de las muestras Pnidi y Pnife.....	82
Cuadro XXXIV. Resumen de los valores de polifenoles totales obtenidos para los extractos polifenólicos de las muestras de <i>P. nigrum</i> , mediante el método Folin-Ciocalteu.	82
Cuadro XXXV. Valores de actividad antioxidante para <i>C. annuum</i> obtenidos por el método DPPH.	83
Cuadro XXXVI. Valores de actividad antioxidante para <i>P. nigrum</i> obtenidos por el método DPPH.	84
Cuadro XXXVII. Valores de actividad antioxidante para <i>C. annuum</i> obtenidos por el método ORAC.	84

Cuadro XXXVIII. Valores de actividad antioxidante para <i>P. nigrum</i> obtenidos por el método ORAC.....	85
Cuadro XXXIX. Valores de los capsaicinoides principales (en mg/100 g muestra seca), reportados en la literatura para <i>Capsicum spp.</i>	99
Cuadro XL . Valores de las piperamidas principales (en mg/100 g muestra seca), reportados en la literatura para <i>P. nigrum.</i>	101
Cuadro XLI. Comparación en la cuantificación de piperina entre las muestras de <i>P. nigrum</i> de Costa Rica, con muestras de otros países y/o tipos de pimienta, por perfil de pico de imagen y por densitometría.	103
Cuadro XLII. Identificación de piperamidas en las fracciones de la separación semipreparativa de Pnien.....	104
Cuadro XLIII. Contenido polifenólico total reportado en <i>Capsicum spp</i> , analizado mediante el método Folin-Ciocalteu.	124
Cuadro XLIV. Contenido polifenólico total reportado para <i>P. nigrum</i> , analizado mediante el método Folin-Ciocalteu.	125
Cuadro XLV. Actividad antioxidante por el método DPPH reportada en <i>Capsicum spp.</i> ...	125
Cuadro XLVI. Actividad antioxidante reportada en <i>P. nigrum</i> mediante el método DPPH.	126
Cuadro XLVII. Actividad antioxidante reportada para <i>Capsicum spp</i> por el método ORAC.	127
Cuadro XLVIII. Actividad antioxidante por el método ORAC reportada en <i>P. nigrum.</i>	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de las familias de compuestos de interés para el proyecto: polifenoles, comunes en ambas plantas; piperina, una piperamida, características en <i>P. nigrum</i> ; y capsaicina, un capsaicinoide, característicos en <i>C. annuum</i>	1
Figura 2. Estructura de la capsaicina, el capsaicinoide mayoritario en <i>C. annuum</i>	2
Figura 3. Estructuras de a) dihidrocapsaicina y b) nordihidrocapsaicina.	2
Figura 4. Estructura de la piperina, la piperamida más abundante en <i>P. nigrum</i>	3
Figura 5. Estructura de a) piperlonguminina y b) pellitorina, presentes en <i>P. nigrum</i>	3
Figura 6. Estructura de a) guineensina y b) retrofractamida A, presentes en <i>P. nigrum</i>	4
Figura 7. Ventas totales de suplementos nutricionales en los Estados Unidos de América entre 2012 y 2020. Fuente: Smith et al., (2021).	13
Figura 8. Número total de suplementos nutricionales comerciales registrados en los Estados Unidos de América que contienen (a) chile picante, o (b) pimienta negra. Fuente: National Institutes of Health (NIH), 2022.....	14
Figura 9. Curva de calibración de la capsaicina a través de cuantificación por UPLC-DAD a 282 nm.....	31
Figura 10. Curvas de calibración de la piperina a través de cuantificación por UPLC-DAD, a 280 nm (●) y 340 nm (▲).	33
Figura 11. Cromatograma de extracción de iones (XIC) del análisis UPLC-Q-TOF para los picos: a) 1, 2, 4, 5 y 7; b) 3, 6 y 8; c) 9, 10, 11 y 12, del extracto de <i>C. annuum</i>	35
Figura 12. Cromatograma de extracción de iones XIC del análisis UPLC-Q-TOF de extractos de <i>P. nigrum</i> , separado en grupos (a-d) para facilitar su visualización.....	37
Figura 13. Análisis de las muestras Pnien (punto de aplicación 6) y Pnife (punto de aplicación 7) por HPTLC según el método de HPTLC Association. a) Revelado en luz UV a 254 nm,	

b) revelado en luz UV a 366 nm, c) revelado posterior a la derivatización en luz UV a 366 nm, d) revelado posterior a la derivatización en luz blanca.	45
Figura 14. Análisis de las muestras Pnien (punto de aplicación 9) y Pnife (punto de aplicación 10) para cuantificación de piperina por interpolación en curva de calibración (puntos de aplicación 2-6). Revelado en a) luz UV a 254 nm, b) luz UV a 366 nm, c) posterior a la derivatización en luz UV a 366 nm, d) posterior a la derivatización en luz blanca. ...	46
Figura 15. Espectros: a) ^1H -RMN (400 MHz) b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la piperina aislada, en CD_3OD	48
Figura 16. Cromatogramas obtenidos para a) fracción 6, guineensina; y b) fracción 9, (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida.	51
Figura 17. Espectros de guineensina aislada en la fracción 6. a) ^1H -RMN, 400 MHz, b) ^{13}C -RMN, 100 MHz. Solvente: CDCl_3	52
Figura 18. Espectros en CDCl_3 . a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida, aislada en la fracción 9.	54
Figura 19. Cromatograma obtenido para la fracción 8, (2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida.....	56
Figura 20. Espectros a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la fracción 8 en CDCl_3 , con el compuesto mayoritario (2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida.	57
Figura 21. Cromatogramas individuales de las fracciones de <i>C. annuum</i> . a) Fracción 3, mayoritariamente capsaicina; b) fracción 5, dihidrocapsaicina; y c) fracción 6, homocapsaicina.....	60
Figura 22. Espectros a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la fracción 3 en CDCl_3 , con capsaicina como compuesto mayoritario.....	61
Figura 23. Espectros a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) en CDCl_3 de la fracción 5, correspondiente a dihidrocapsaicina.	63

Figura 24. Espectros a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la fracción 6 en CDCl_3 , homocapsaicina.....	65
Figura 25. Cromatograma UPLC-ESI-MS (Orbitrap XL), para el extracto polifenólico de chile.	72
Figura 26. Cromatograma UPLC-ESI-MS medido en un Orbitrap XL, para el extracto polifenólico de pimienta.....	76
Figura 27. Estructura y patrón de fragmentación para la capsaicina, norcapsaicina y nornorcapsaicina.	86
Figura 28. Estructura y patrón de fragmentación para la dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y nornordihidrocapsaicina.	87
Figura 29. Estructura y fragmentos de homocapsaicina I y homodihidrocapsaicina I.	88
Figura 30. Estructura y fragmentación de la oleamida y la 13-docosenamida.	88
Figura 31. Estructura de la capsiamida.....	89
Figura 32. Estructura de la octadecanamida.	89
Figura 33. Estructura y principales fragmentos de compuestos con el grupo metilendioxfenilo y cadena lateral de isobutilamina.	91
Figura 34. Estructura y fragmentación de metilendioxfenil amidas con cadena lateral de pirrolidina.	92
Figura 35. Estructura y fragmentación de metilendioxfenil amidas con cadena lateral de piperidina.....	94
Figura 36. Estructura y fragmentación de la piperflaviflorina B.....	95
Figura 37. Estructura de los compuestos con cadena lineal en el extremo C de la amida. .	97
Figura 38. Estructura de (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4-octadecadienamida, en fracción 9.	105
Figura 39. Estructura de (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4,12-octadecatrienamida en la fracción 8.	105

Figura 40. Estructura de la guineensina.	106
Figura 41. Estructura de la piperina.....	107
Figura 42. Estructura de la capsaicina.	108
Figura 43. Estructura de la homocapsaicina II.....	109
Figura 44. Estructura de la dihidrocapsaicina.....	109
Figura 45. Estructura del ácido quínico y fragmentaciones importantes.	110
Figura 46. Estructura y fragmentos del ácido sinápico.....	111
Figura 47. Estructura y fragmentos principales del vanilloil <i>O</i> -hexosa.	111
Figura 48. Estructura y fragmentación para coumaroil <i>O</i> -hexosa y feruloil <i>O</i> -hexosa.	112
Figura 49. Estructura y fragmentación del ácido cafeoilquínico.	113
Figura 50. Estructura de las apigenina <i>C</i> -glicosiladas con sus fragmentaciones características.....	114
Figura 51. Estructura y fragmentación de la luteolina <i>C</i> -hexósido.	115
Figura 52. Estructura y patrón de fragmentación de la Isoramnetina <i>O</i> -rutinósido.....	115
Figura 53. Estructura y principales fragmentos para los compuestos derivados del metilorobol.....	116
Figura 54. Estructura y fragmentación principal de la sacarosa.....	117
Figura 55. Estructura del ácido 4- <i>O</i> -metilglucónico y representación de sus fragmentos principales.	118
Figura 56. Estructura y fragmentos principales de la periplobiosa.	118
Figura 57. Estructura y fragmentación de los derivados del hidroxitirosol.....	119
Figura 58. Estructura y fragmentos importantes del ácido dihidrofaseico <i>O</i> -hexósido.....	120
Figura 59. Estructura y fragmentación del ácido siríngico.	120

Figura 60. Estructura y fragmentación los compuestos C-glicosilados de apigenina.....121

Figura 61. Estructura y fragmentación de la luteolina O-desoxihexosil-O-pentosa.....122

Figura 62. Estructura y fragmentación de la apigenina O-apiosil-O-desoxihexósido.....122

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Porcentaje

[M+H]⁺: Ion molecular cargado positivamente por ganancia de un protón

[M-H]⁻: Ion molecular cargado negativamente por pérdida de un protón

°C: Grados Celsius

¹³C: Isótopo carbono-13

¹H: Isótopo de hidrógeno-1

AAPH: diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AcOEt: Acetato de etilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGE: Ácido gálico equivalente

ANOVA: Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)

ARN: Ácido ribonucleico

CDCl₃: Cloroformo deuterado

Da: Dalton

DAD: Detector de arreglo de diodos

DDA: Análisis dependiente de datos (por sus siglas en inglés)

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EPR: resonancia paramagnética electrónica (por sus siglas en inglés)

ESI: Ionización química por electrospray (por sus siglas en inglés)

F₂₅₄: Indicador de fluorescencia a 254 nm

FAAH: Hidrolasa de ácidos grasos (por sus siglas en inglés)

FC: Folin-Ciocalteu

FRAP: Análisis de potencial reductor férrico (Por sus siglas en inglés)

g: gramos

h: Horas

ha: Hectárea

HCC: Carcinoma hepatocelular

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)

HPTLC: Cromatografía de capa delgada de alta resolución (por sus siglas en inglés)

HRMS: Espectroscopía de masas de alta resolución (por sus siglas en inglés)

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

kV: Kilovoltios

L: Litro

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

LD₅₀: Dosis letal media

m/z: Relación masa/carga

mbar: Milibar

CD₃OD: Metanol deuterado

MeOH: Metanol

mg: miligramo

MHz: Megahercios

min: Minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mmol: Milimol

MOM: Materiales orgánicos multicomponentes

MS: Espectroscopía de masas

MSⁿ: Fragmentos de masas de nivel n (con $n = 2-5$)

N.C.: No cuantificable

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)

nm: Nanómetros

ORAC: Análisis de capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (por sus siglas en inglés)

pH: Potencial de hidrógeno

PLE: Extracción líquida presurizada (por sus siglas en inglés)

ppm: Partes por millón

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior

psi: libra de fuerza por pulgada cuadrada

Q-TOF: Detector cuadrupolo-tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)

REDIBERO: Red Iberoamericana de Entidades de Promoción de Exportaciones y Atracción de Inversiones

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)

s: Segundos

TE: Trolox equivalente

t_R: Tiempo de retención

Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UHPLC/UPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (por sus siglas en inglés)

USP: Farmacopea de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)

UV-VIS: Ultravioleta-visible

V: Voltios

XIC: Cromatograma de extracción de iones

δ: Desplazamiento químico

μg: Microgramos

μmol: Micromol



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Luis Felipe Vargas Huertas, con cédula de identidad 1-1530-0743, en mi condición de autor del TFG titulado ESTUDIO DE METABOLITOS CARACTERÍSTICOS Y POLIFENOLES DE LAS ESPECIES CAPSICUM ANNUUM Y PIPER NIGRUM, CULTIVADAS EN COSTA RICA

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO*

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los efectos beneficiosos observados en campos variados como la alimentación, la medicina o la agricultura, han generado interés en el estudio de los metabolitos presentes en diferentes plantas. En este contexto, los frutos del chile picante (*Capsicum annuum*) y la pimienta (*Piper nigrum*) son conocidos por su uso como especias en gastronomía, cultivadas en Costa Rica con una producción nacional importante, pero donde los estudios realizados se han enfocado en las características físicas y organolépticas, sin enfatizar en su caracterización química.

Los principales metabolitos característicos para estas plantas se ilustran en la Figura 1, siendo de interés su caracterización, cuantificación y la medición de su actividad antioxidante en plantas costarricenses.

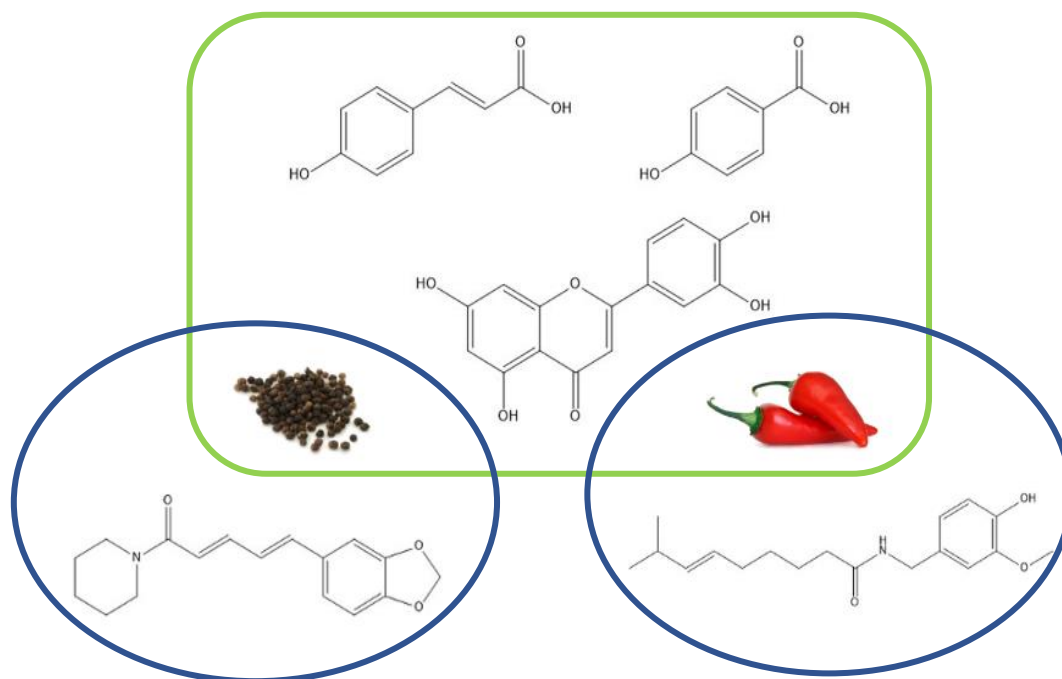


Figura 1. Diagrama de las familias de compuestos de interés para el proyecto: polifenoles, comunes en ambas plantas; piperina, una piperamida, características en *P. nigrum*; y capsaicina, un capsaicinoide, característicos en *C. annuum*.

1.1 Perfil y propiedades de las capsaicinas en Chile y de las piperamidas en pimienta

Para *Capsicum annuum* se encuentra que los capsaicinoides son los metabolitos mayoritarios en el fruto y entre éstos la capsaicina, ilustrada en la Figura 2, es el metabolito principal (Meckelmann et al., 2013).

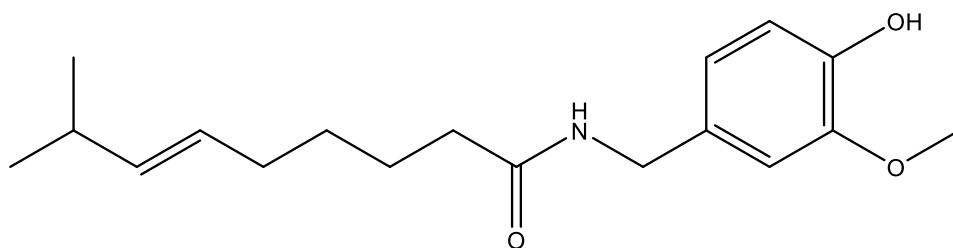


Figura 2. Estructura de la capsaicina, el capsaicinoide mayoritario en *C. annuum*.

Otras amidas importantes son la dihidrocapsaicina y la nordihidrocapsaicina (Meckelmann et al., 2013), ilustradas en la Figura 3.

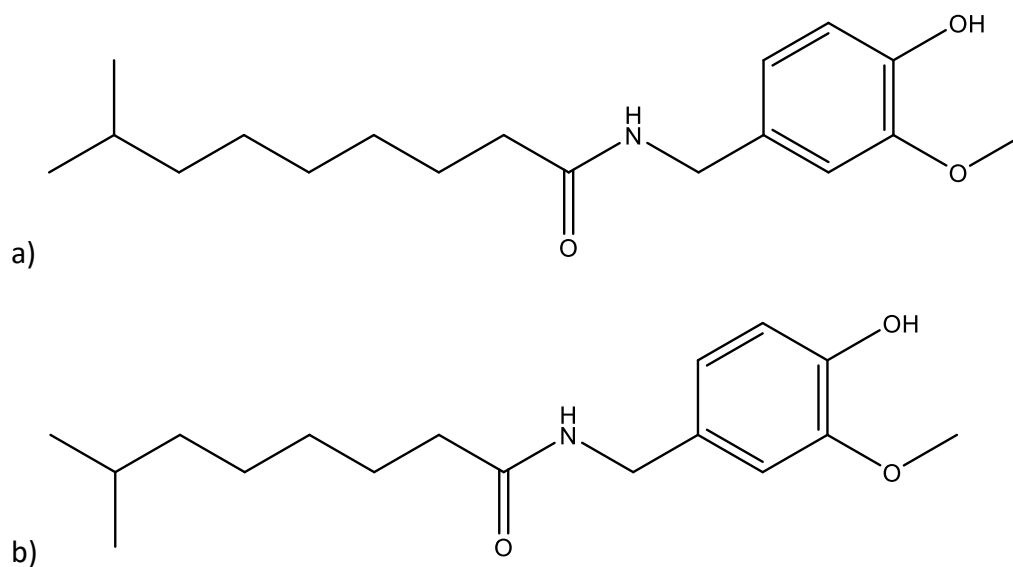


Figura 3. Estructuras de a) dihidrocapsaicina y b) nordihidrocapsaicina.

En el caso de *Piper nigrum*, conocida como pimienta negra, las piperamidas son las que constituyen los compuestos más importantes y la piperina, ilustrada en la Figura 4, corresponde a la amida principal (Scott et al., 2005).

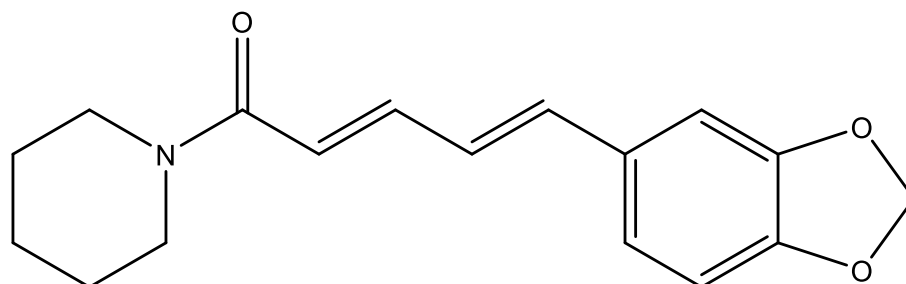


Figura 4. Estructura de la piperina, la piperamida más abundante en *P. nigrum*.

Entre otras amidas de importancia reportadas, como se ilustra en la Figura 5, se encuentran la piperlonguminina y la pellitorina (Scott et al., 2005).

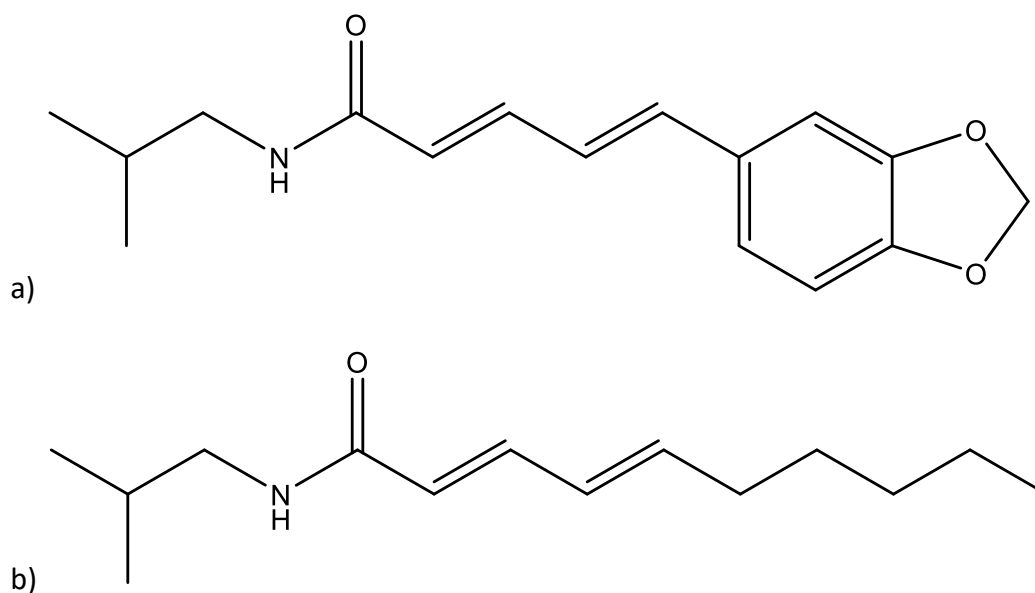


Figura 5. Estructura de a) piperlonguminina y b) pellitorina, presentes en *P. nigrum*.

Otras amidas identificadas en esta especie son la guineensina y la retrofractamida A (Park et al., 2002), ilustradas en la Figura 6.

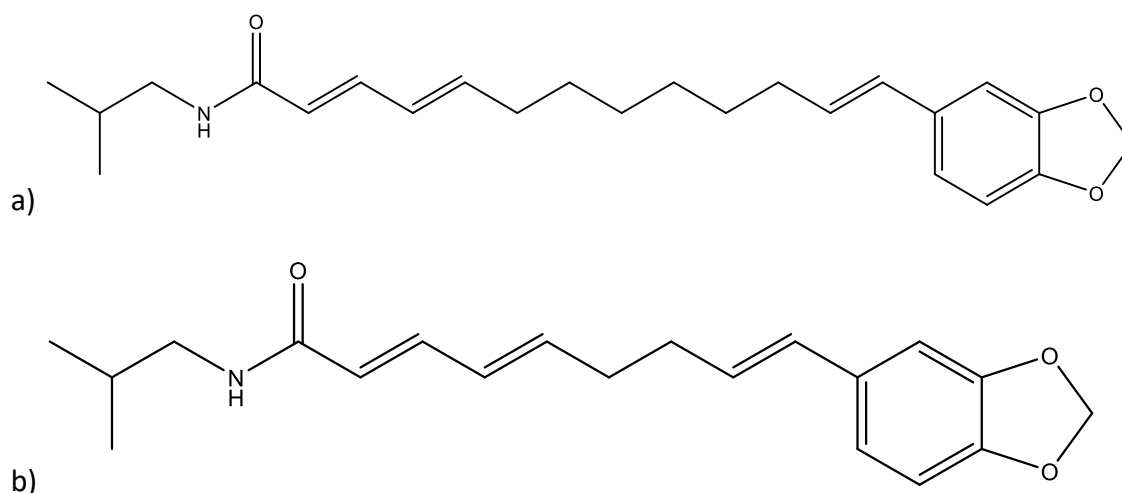


Figura 6. Estructura de a) guineensina y b) retrofractamida A, presentes en *P. nigrum*.

En cuanto a las propiedades bioactivas de estas amidas, se tiene que la capsaicina, el principal metabolito de *C. annuum*, actúa como protector del sistema neurológico, por ejemplo, permitiendo reducir reacciones de inflamación neurológica a través de la reducción de neuropéptidos de las terminales nerviosas, y se asocia a alteraciones de metabolismo celular al ser utilizada en altas concentraciones por periodos de tiempo extendidos, incluyendo la supresión de la respiración mitocondrial; también tiene impacto en la patogénesis de carcinoma hepatocelular (HCC), dado el efecto antitumoral sinérgico de la capsaicina con sorafenib, el fármaco más conocido y utilizado para el tratamiento de HCC (Scheau et al., 2019).

Por otro lado, la capsaicina ha mostrado actividad en el tratamiento de reflejos del sistema respiratorio superior, en la prevención de adipogénesis, en el incremento del metabolismo y la regulación de respuestas inmunes (Huang et al., 2013), mostrando asimismo gran potencial por sus propiedades en el tratamiento del dolor en conjunto con otros analgésicos, así como su aporte en el tratamiento de enfermedades vasculares y sus efectos gastro protectores (Basith et al., 2016).

Adicionalmente, se ha reportado que la capsaicina inhibe, tanto *in-vitro* como *in-vivo*, el crecimiento en células tumorales de próstata y que induce apoptosis a través de la

disipación de potencial interno transmembrana mitocondrial y la activación de la caspasa 3, donde un mecanismo de acción similar ha sido observado en cáncer de colon y de páncreas tratados con capsaicina (Chapa-Oliver & Mejía-Teniente, 2016).

Por otro lado, *P. nigrum* ha sido estudiada por su uso en el tratamiento de afecciones respiratorias como bronquitis, reumatismo o enfermedades intestinales como diarrea (Salehi et al., 2019); así como por propiedades anticancerígenas, analgésicas, anticonvulsivas, antidepresivas y hepato-protectoras, habiéndose reportado su potencial uso terapéutico para tratar problemas de sueño y estados relacionados con la ingesta de cafeína (Yoon et al., 2022).

Por su parte, se ha reportado que la piperina, la amida más abundante en *P. nigrum*, ejerce efectos anti-inflamatorios, neuroprotectores, inmunomodulatorios, cardioprotectores y anticancerígenos (Turrini et al., 2020). Asimismo, aumenta la biodisponibilidad de fármacos y nutrientes, incrementando la absorción intestinal y regulando el metabolismo y transporte (Katarina et al., 2019). Además, los efectos de la piperina asociados a quimioterapias anticáncer tradicionales ha sido objeto de estudios recientes con perspectivas prometedoras del uso de la piperina (Turrini et al., 2020).

Adicionalmente, extractos de *P. nigrum* han mostrado actividad antibacteriana ante *C. albicans*, *E. coli*, *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., y *Salmonella* spp; y también se reporta su potencial contra enfermedades crónicas por sus actividades antiproliferativas, antiinflamatorias y neuro-farmacológicas (Salehi et al., 2019).

Por otro lado, las propiedades de estos metabolitos permiten que estas especies sean utilizadas en la agricultura como un reemplazo de los agroquímicos en el control de plagas. En relación con estos efectos, se ha encontrado en la literatura que el extracto metanólico de *C. annuum* tiene una mortalidad de hasta 45% en el ácaro *Tetranychus urticae*, con exposición de 24 h, aproximadamente la mitad de la mortalidad del control positivo 2-tridecanona. Además, posee actividad repelente con valores EC_{50} mínimos de hasta $0.0035 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Antonious et al., 2006).

Asimismo, la capsaicina inhibe el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* en concentraciones de 25 µg/mL (Molina-Torres et al., 1999) y actúa en sinergia con un insecticida organofosforado (pirimifos-metil en concentración final de 2.25 g/L) contra el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) aumentando la tasa de mortalidad de un 67% para el organofosforado solo, hasta un 92% al aplicar ambos productos juntos, en concentraciones de capsaicina de 10^{-7} mol/L (Maliszewska & Tęgowska, 2012).

Otros estudios muestran que al utilizar un extracto etanólico de *P. nigrum* se obtiene una mortalidad mayor al 90% sobre los coleópteros *Sitophilus oryzae* y *Callosobruchus maculatus* al aplicarlo en una concentración de 6.25 µg/insecto por tres días (H. C. F. Su, 1977). El extracto metanólico, en concentración de 100 µg/mL y exposición de 48 horas, tiene una mortalidad del 100% sobre *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *Aedes togoi*, donde los principales componentes con actividad insecticida son la piperida y retrofractamida A, seguido en importancia por la pelitorina, guineensina y por último la piperina, que no se muestra tan efectiva (Park et al., 2002).

También contra *Callosobruchus maculatus*, los componentes aislados de la *P. nigrum* logran resultados de LD₅₀ de entre 0.25 y 2.18 µg/insecto en machos, y entre 1.43 y 6.70 µg/insecto en hembras, para pelitorina, guineensina y piperida (H. C. F. Su & Horvat, 1981).

Entre estas amidas, la piperina ha sido objeto de aplicaciones y estudios recientes por sus propiedades de potenciar la solubilidad en plasma de metabolitos naturales o de fármacos a través de la formación de materiales orgánicos multicomponentes (MOM). Así, aumentan los efectos positivos de fármacos como la lovastatina y el ibersartán que se encuentran limitados por su baja solubilidad acuosa y que, adicionalmente, su biodisponibilidad es afectada por el proceso de glucoronidación, ante el que la piperina ha exhibido inhibición; por lo que se ha encontrado que la piperina puede incrementar la biodisponibilidad de estos fármacos (Wilhelm-Romero et al., 2022).

Entre los materiales orgánicos multicomponentes, las mezclas eutécticas poseen características que incrementan la solubilidad, por ejemplo, con menor punto de fusión que los compuestos puros, tamaño de partícula reducidos y menores temperaturas de procesos

(Vippagunta et al., 2007). En este contexto, es de interés la piperina, por su potencial demostrado en la formación de mezclas eutécticas con estos dos fármacos y con la curcumina, que resultaron en solubilidad acuosa incrementada y velocidad de disolución relacionada con la mayor humectabilidad asociada con el decrecimiento observado en el ángulo de contacto (Wilhelm-Romero et al., 2022).

Incluso, extractos de pimienta negra con contenido conocido de piperina se comercializan bajo marcas registradas, por ejemplo, BioPerine®, promovida por sus propiedades para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, habiéndose realizado estudios clínicos en los Estados Unidos de Norte América y otros países, que han evidenciado su seguridad y eficacia para uso nutricional (Sabinsa Corporation, n.d.).

Por otro lado, otras amidas de *Piper spp.* han cobrado interés reciente debido a sus propiedades bioactivas, tal como en inhibidores de captación celular de la anandamida endocanabinoide. En efecto, estudios de estructura-actividad indican la importancia de la longitud de las cadenas alquílicas de moléculas como la guineensina, que inhibe específicamente la captación de endocanabinoides en diferentes líneas celulares independientes de la hidrolasa de ácidos grasos (FAAH por sus siglas en inglés), lo que la convierte en un metabolito de enorme interés por sus implicaciones en estas actividades farmacológicas (Nicolussi et al., 2014).

Lo aquí descrito muestra la relevancia del estudio fitoquímico de las amidas de los frutos de estas dos especies cultivadas en Costa Rica, tanto por la adquisición de conocimiento científico como por la relevancia que tienen sus aplicaciones para los productores nacionales, así como para su comercialización dado el potencial bioactivo de estos metabolitos.

1.2 Perfil y propiedades de los polifenoles en Chile y pimienta

En las dos especias ha sido reportado la presencia de polifenoles, donde las metodologías utilizadas en la extracción involucran normalmente el uso de disolventes polares o disoluciones acuosas (McRae et al., 1982; Tomás-Barberán et al., 1992).

Los compuestos polifenólicos han generado gran interés en los años recientes, tanto para su investigación como en el consumo de alimentos y bebidas ricos en estos compuestos, principalmente por su acción como sustancias antioxidantes. Esta actividad no es exclusiva para un tipo de molécula oxidante, sino que son funcionales tanto en la neutralización de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) como el ion hidroxilo (OH^\cdot) o el ion superóxido (O_2^\cdot), como también actúan de quelantes con metales de transición que están involucrados en la formación de radicales libres (Brglez Mojzer et al., 2016).

Este tipo de especies reactivas provoca reacciones no controladas con las biomoléculas de los organismos vivos, incluyendo ácidos grasos de la membrana celular, proteínas, cadenas de ácido ribonucleico (ARN) o incluso con cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Jacob et al., 2013). Estos procesos son parte del estrés oxidativo asociado al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades como artritis reumatoide, Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares (Mariani et al., 2005; Pignatelli et al., 2018), o incluso cáncer (Arfin et al., 2021; Reuter et al., 2010).

En este sentido, diversos estudios poblacionales y ensayos clínicos han demostrado que los polifenoles tienen efectos benéficos de regulación de los procesos metabólicos y protección celular, reduciendo los cambios asociados al envejecimiento (Leri et al., 2020).

Estos resultados se complementan con pruebas *in vitro* e *in vivo*, donde se demuestra la actividad antioxidante de los polifenoles vía quelación de metales, estabilización por resonancia de radicales, u oxidación de especies reactivas (Quideau et al., 2011). Sin embargo, los beneficios de los compuestos polifenólicos son más amplios, e

incluyen protección contra luz ultravioleta, parásitos o patógenos, así como efectos antiinflamatorios y anticancerígenos con varios tipos de cáncer (Brglez Mojzer et al., 2016; Koch, 2019; Tresserra-Rimbau et al., 2018).

Existen diferentes metodologías para cuantificar la actividad antioxidante de extractos o de compuestos específicos. Uno de los métodos de referencia más utilizados lo constituye el análisis de Folin-Ciocalteu (FC) que se utiliza para cuantificar los polifenoles totales y evaluar la capacidad reductiva de moléculas y extractos, a través de un mecanismo de transferencia de electrón y que involucra la oxidación de los grupos fenólicos por acción de sales de tungsteno y molibdeno en medio básico (Platzer et al., 2021; Slinkard & Singleton, 1977).

Por otro lado, la capacidad de eliminación de radicales libres se puede realizar a través de uno de los ensayos más utilizados que es el DPPH, en el que se analiza la inhibición por el radical libre estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) mediante colorimetría por absorbancia a 540 nm, luego de incubar la muestra junto con el radical (Niki, 2011). Se elabora una curva respecto a la concentración, y se calcula el valor IC_{50} (concentración a la que se obtiene un 50% de inhibición) tomando el blanco como referencia.

Cabe mencionar, que a diferencia del análisis ORAC, que se describe más adelante, en el ensayo de DPPH un incremento en la actividad antioxidante se refleja en una disminución en el valor IC_{50} (Katsube et al., 2004). Si bien se había considerado anteriormente que el mecanismo podría ser mixto, es decir de transferencia de electrón y de transferencia de hidrógeno, estudios cinéticos para este ensayo han mostrado que la etapa determinante de la velocidad envuelve una transferencia rápida de electrones de los de los aniones fenóxido al DPPH, en solventes orgánicos próticos (Foti et al., 2004).

Otro análisis colorimétrico utiliza el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) en su forma aniónica ($ABTS^{\bullet-}$) obtenida al hacer reaccionar el ABTS con persulfato de potasio (Re et al., 1999); el ensayo del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) utiliza la autooxidación del pirogalol para determinar la capacidad de la muestra de inhibir éste ion, en un medio con luminol y pH controlado, donde la medición se realiza con resonancia

paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés) (N. Li et al., 2008) y el análisis de potencial reductor férrico (FRAP por sus siglas en inglés) mide la reducción del hierro (III) a hierro (II) en el complejo tripiridil-triazina por una reacción de óxido-reducción (Borges et al., 2010).

Sin embargo, una de las técnicas con ventajas es el análisis de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés), que se basa en la eficiencia de la muestra para reducir el efecto de radicales peróxidos liberados por una disolución de AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida) sobre la fluoresceína, midiendo el decaimiento en la fluorescencia de ésta a través del tiempo.

En este análisis ORAC, se realiza una correlación del área bajo la curva contra la concentración de muestra, y se compara con una curva de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) que se utiliza como patrón de referencia. Cuanto mayor sea el resultado mejor es la actividad antioxidante de la muestra, pues evita la descomposición de la fluoresceína por acción de los radicales (Dávalos et al., 2004).

En lo referente a la citotoxicidad, el extracto metanólico de *C. annuum* en concentraciones 500 µg/mL tiene efectos antiproliferativos en las líneas celulares cancerígenas MKN45 (96.8%) y HTC116 (80%), llegando incluso a 70% de inhibición en MCF7 a 50 µg/mL (Jeon et al., 2012).

Por otro lado, la piperina, encontrada en *P. nigrum*, a 50 µmol/L disminuye la resistencia al medicamento anticancerígeno doxorubicina en líneas celulares resistentes, reduciendo los valores de IC₅₀ de 40.5 a 1.26 µmol/L en la línea celular MCF-7/DOX, de 4.43 a 0.28 µmol/L en A-549/DOX, y de 37.72 a 5.41 µmol/L para el medicamento Mitoxantrone en MCF-7/DOX (Sen Li et al., 2011).

Con base en lo mencionado, se evidencia la importancia biológica de los metabolitos de las dos especies en estudio, tanto la de sus extractos enriquecidos en amidas como la de sus extractos polares, con contenido polifenólico, donde ambos tipos de compuestos son

objeto del presente trabajo, que constituye asimismo el primer estudio a nivel centroamericano de ambas especies.

1.3 Situación y relevancia de estudios fitoquímicos de estos dos cultivos en Costa Rica

A nivel mundial, el comercio de *Capsicum* se da en forma de fruto seco, con una producción mundial de 4.0 millones de toneladas métricas en el año 2020, pero que alcanzó el máximo de 4.4 millones de toneladas en el 2018 tras un aumento sostenido desde el año 2006 (Tridge, 2022a).

El principal productor corresponde a India que acapara el 44.2% de la producción mundial con 1.70 mil millones de toneladas, seguido por Tailandia y China con 8.0% y el 7.6% del total respectivamente, siendo que un 73.2% de la producción se concentra en países asiáticos; mientras que el país americano con mayor producción es México con 60.7 mil toneladas equivalentes a 1.5% de la producción global (Tridge, 2022a).

En términos económicos, las exportaciones de este producto representaron 6.19 mil millones de dólares en el 2020, con México como principal país exportador abarcando un 23.5% del total, equivalente a 1.46 mil millones de dólares que representa un 56% de aumento desde el año 2015. Estas exportaciones estuvieron dirigidas prácticamente en su totalidad a Estados Unidos, que constituye el principal importador de Chile por un total de 1.9 mil millones de dólares. El resto del mercado de exportación durante el año se concentra en España con 1.39 mil millones de dólares, y Países Bajos en el tercer puesto con 1.17 mil millones de dólares, con destinos variados principalmente en el mercado europeo (Tridge, 2022a).

En cuanto a la pimienta, el mayor productor durante el año 2020 fue Vietnam con 270 mil toneladas métricas, que comprende un 37.8% de la producción total. El segundo lugar lo ocupa Brasil con 115 mil toneladas, mientras que la tercera posición en este ranking pertenece a Indonesia con 89 mil toneladas. La producción global, de 714 mil toneladas

métricas en el 2020, creció un 65% desde el año 2013, luego de un periodo de relativa constancia donde se mantuvo cercano a las 450 mil toneladas métricas anuales en los años 2006-2013 (Tridge, 2022b).

Con respecto a las exportaciones mundiales, abarcaron un total de 1.21 mil millones de dólares en 2020, que sin embargo constituye un decrecimiento de alrededor de 60% respecto al año 2015 y que es consecuente con la tendencia durante el quinquenio. En este apartado, Vietnam es el principal país exportador, abarcando un 43.2% del mercado en 2020 por un valor de 522.5 millones de dólares, seguido por Brasil (187.5 millones de dólares) e Indonesia (156.1 millones de dólares) (Tridge, 2022b), donde el principal destino es nuevamente Estados Unidos con un 16.7% del total equivalente a 180 millones de dólares (The Observatory of Economic Complexity (OEC), 2021)

En cuanto a la comercialización de estos dos productos en la industria de bioactivos, la tendencia global del mercado de suplementos nutricionales ha mostrado un incremento constante en la última década a nivel internacional, como se aprecia en el gráfico de la Figura 7, para el mercado de los Estados Unidos de América, sobrepasando los 11 mil millones de dólares americanos en el 2020, habiendo duplicado las cifras del 2012 (Smith et al., 2021).

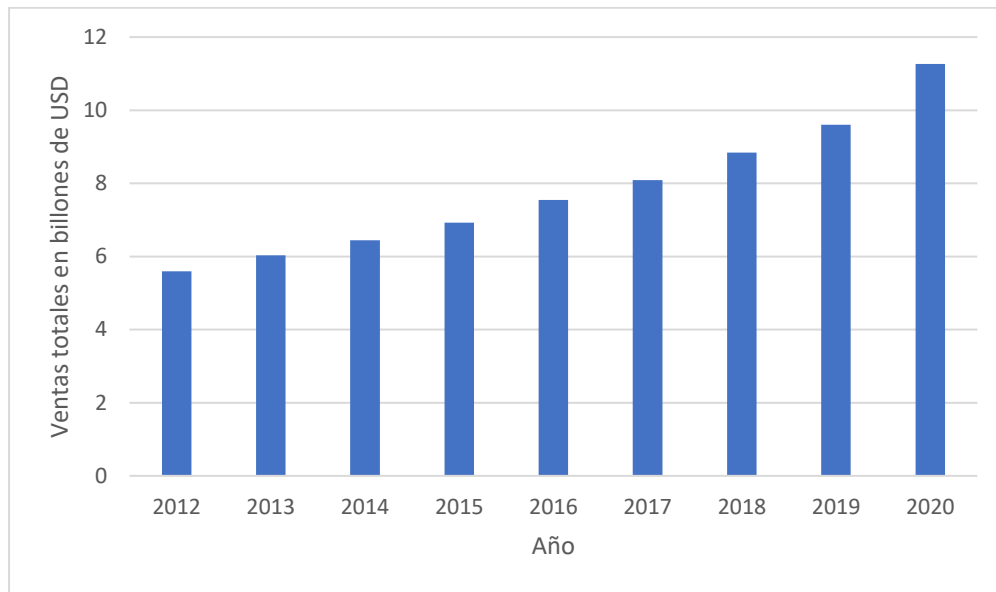


Figura 7. Ventas totales de suplementos nutricionales en los Estados Unidos de América entre 2012 y 2020. Fuente: Smith et al., (2021).

En este contexto, la base de datos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) compila la información para los registros de productos comerciales de suplementos nutricionales, donde los gráficos de la Figura 8 muestran el número de productos registrados de chile picante y pimienta negra en años recientes.

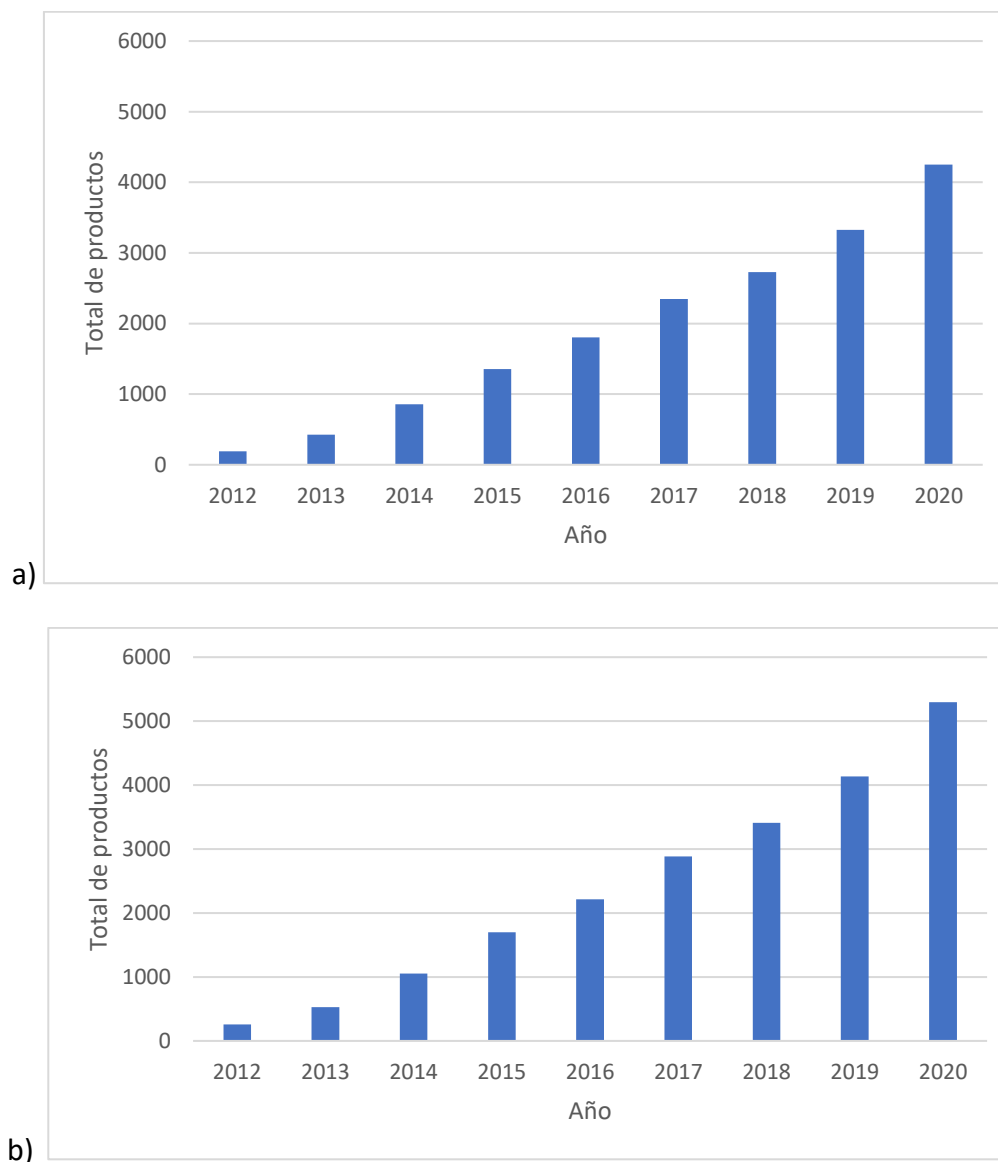


Figura 8. Número total de suplementos nutricionales comerciales registrados en los Estados Unidos de América que contienen (a) chile picante, o (b) pimienta negra. Fuente: National Institutes of Health (NIH), 2022.

Como se puede observar, los suplementos nutricionales conteniendo ambos productos han presentado una tendencia creciente, llegando a sobrepasar los 4 mil productos inscritos en el caso de *Capsicum spp* y los 5 mil productos registrados en el caso de la pimienta negra, remarcando que, en ambos casos, esta cifra representa el doble de los productos registrados en el 2017, dándose en los últimos años un crecimiento promedio

de 25% anual. Por último, cabe mencionar que estos representan el 7.1% del total del mercado estadounidense (National Institutes of Health (NIH), 2022).

Lo aquí expuesto, permite apreciar la importancia de ambos productos en el comercio internacional, tanto en su comercialización como producto fresco y seco para la industria alimentaria como en nichos de mercado especializados por su potencial bioactivo, tal como en el sector de los suplementos nutricionales.

En cuanto a Costa Rica, el chile picante tiene una producción a nivel nacional de poco más de 3500 toneladas métricas (ton) anuales (Barrientos & Chaves, 2008), de las cuales la fracción que se exporta se hace en forma de salsas mayoritariamente, y genera ingresos por \$55 millones en siete meses (PROCOMER, 2015a). Para la especie *C. annuum*, sin distinción entre las variedades dulces y picantes, se reporta un área de producción de 1085 hectáreas (ha) agrupadas en Alajuela y Cartago principalmente (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2015).

Para la pimienta, la producción es cercana a las 1000 ton, provenientes en su mayoría de Sarapiquí y San Carlos (Barrientos & Chaves, 2008), que cubren más del 95% del cultivo nacional cuya extensión se estima en 380 ha (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2015) y genera ingresos por exportación de \$1500 millones (PROCOMER, 2015b).

Por otro lado, los estudios de estas especias en Costa Rica no ahondan en la caracterización fitoquímica ni la cuantificación de sus componentes, importantes por cuanto los metabolitos se constituyen como buenos descriptores no sólo de la calidad y el valor nutricional del producto, sino también de su valor comercial y la aplicabilidad en otros campos.

Como se ha mencionado, el potencial de los metabolitos bioactivos que ha incidido en el incremento de la comercialización de suplementos nutricionales a nivel internacional, ha conllevado también en el país a que la Promotora del Comercio Exterior (PROCOMER) promocióne el potencial de productos costarricenses para su introducción en cadenas de valor en el ámbito internacional.

Entre estos, PROCOMER incluyó al chile picante en la Feria EXPOCOMER 2018 en Panamá (PROCOMER, 2018), mientras que la pimienta fue promocionada en la Feria FRUITLOGISTICA 2019 en Alemania (PROCOMER, 2019), así como en la Red Iberoamericana de Entidades de Promoción de Exportaciones y Atracción de Inversiones (REDIBERO) con compradores de países europeos, tales como Alemania, España, Francia, Italia y Polonia en marzo del 2021 (PROCOMER, 2021).

Los diferentes aspectos descritos en la Introducción muestran la relevancia del estudio fitoquímico de los frutos de chile picante y pimienta negra costarricense, tanto por la importancia del conocimiento científico como por la realimentación de la información con los productores en cuanto a los metabolitos secundarios con sus potenciales bioactividades, que permitan favorecer la comercialización de los mismos en segmentos de mercado especializados, incluyendo productos elaborados de mayor valor agregado, como es el de los suplementos nutricionales.

Con esto en cuenta, el objetivo del presente trabajo corresponde al estudio de la composición de los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante para las especies *Capsicum annuum* y *Piper nigrum* cultivadas en Costa Rica.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y METODOS

2.1 Equipo, Materiales y Reactivos

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Baño Ultrasónico: Branson 5510.
- Bomba de vacío Vacuumbrand PC 520 NT.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent Infinity1260 con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos (DAD).
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) Dionex Ultimate 3000 con bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna y detector de arreglo de diodos DAD, acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Thermo Scientific MSQ Plus.
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) Thermo Scientific Accela con bomba binaria y detector DAD, acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL.
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UPLC) Waters Aquity H Class con bomba cuaternaria acoplado a espectrómetro de masas de alta resolución Xevo G2-XS QTOF.
- Equipo de cromatografía de capa delgada de alta resolución (HPTLC) CAMAG con automuestreador ATS 4, cámara automática ADC 2, calentador TLC Plate Heater 3, Derivatizer, TLC Visualizer 2 y TLC Scanner 4.
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS.
- Extractor líquido presurizado Dionex ASE 150.
- Fluorómetro Thermo Scientific Fluoroskan Ascent.
- Liofilizador Labconco Free Zone Cascade Benchtop.
- Rotavapor Büchi R-210 con baño regulador de temperatura Büchi B-491.
- Unidad de Resonancia Magnética Nuclear Bruker 400 MHz.

En cuanto a materiales y reactivos, se listan a continuación:

- Columna HPLC semipreparativa Synergi Polar-RP (150 x 10 mm, 4 μ m).
- Columnas HPLC analíticas: Phenomenex Luna C18(2) (150 x 4.6 mm, 5 μ m), Phenomenex Synergi Polar-RP (150 x 4.6 mm, 4 μ m), Thermo FisherScientific Hypersil Gold AQ C18 (200 x 2.1 mm, 1.9 μ m).
- Cromatofolios TLC (20 x 20 cm) Merck, gel sílice 60 F₂₅₄.
- Placas de vidrio para HPTLC Merck Si 60 F₂₅₄ 20x10 cm.
- Gel de sílice para cromatografía en columna Sigma Aldrich 70-230 mesh.
- Como estándares se utilizan ácido gálico, borneol y piperina (97%) de Sigma-Aldrich, y capsaicina (94.1%) de USP.
- Hidróxido de sodio de Riedel-de Haën.
- Carbonato de sodio, fluoresceína de sodio, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida), y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) son de Sigma-Aldrich.
- Sulfato de litio monohidratado de J. T. Baker.
- Tierra de diatomeas Thermo Scientific para ASE.
- Los disolventes deuterados, metanol-d₄ y cloroformo-d, son Sigma-Aldrich.
- Los disolventes metanol, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, hexano, acetona y ciclohexano; así como el ácido fórmico, áclorhídrico concentrado y ácido fosfórico concentrado; son Sigma-Aldrich, Merck, J. T. Baker o Honeywell.

2.2 Metodología

Las extracciones de las muestras, separaciones y aislamiento de compuestos, los análisis cuantitativos y los análisis de actividad antioxidante fueron realizados en el laboratorio BioDESS de la Escuela de Química, Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica). El análisis de amidas por UHPLC-HRMS se realizó en el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (Cartago, Costa Rica). El análisis de polifenoles por UHPLC-HRMS fue realizada en el Methods and Application of Food Composition Laboratory del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Maryland, Estados Unidos). Los análisis por HPTLC fueron realizados en el laboratorio de CAMAG (Basel, Suiza).

2.2.1 Características y procesamiento de las muestras

Las muestras de chile picante (*Capsicum annuum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) fueron obtenidas con la colaboración del Ing. Luis Fernando Mora, Gerente de PROPICA, empresa líder en la comercialización y exportación de chile y pimienta costarricense. Se recolectó 1 kg de cada muestra en la empresa PROPICA ubicada en La Tigra de San Carlos, en marzo del 2016, las cuales tenían las características mostradas en el Cuadro I. Las muestras fueron facilitadas en bolsas con cierre hermético, y provenían de los respectivos lotes de producción, de manera que correspondían a productos aptos para la comercialización.

Cuadro I. Descripción de las muestras de *C. annuum* y *P. nigrum* obtenidas de PROPICA.

Muestra	Origen	Mes de cosecha	Código asignado
Chile	La Fortuna, San Carlos	Marzo 2016	Cahfo
Chile	Pueblo Nuevo, Sarapiquí	Marzo 2016	Cahpn
Chile	Valle Azul, San Ramon	Marzo 2016	Cahva
Pimienta	La Tigra, San Carlos	Diciembre 2015	Pnidi
Pimienta	La Tigra, San Carlos	Enero 2016	Pnien
Pimienta	La Tigra, San Carlos	Febrero 2016	Pnife

Las muestras de pimienta se recibieron secas y se guardaron debidamente rotuladas y en bolsas de congelar con cierre hermético a una temperatura de -20 °C.

Las muestras de chile se recibieron frescas, habiéndose cosechado en su punto de madurez para comercialización. Se procedió a picar en trozos pequeños y congelar a -20 °C, para su posterior liofilización en un equipo Labconco Free Zone Cascade Benchtop, con capacidad de 4.5 L, colector con temperatura de -105 °C sistema de vacío $< 133 \times 10^{-3}$ mbar. El material liofilizado se obtuvo con rendimientos de 10.7%, 10.2% y 10.4% para las muestras Cahfo, Chapn y Cahva respetivamente. El material liofilizado fue preservado en bolsas de congelar con cierre hermético a una temperatura de -20 °C.

2.2.2 Proceso de extracción para obtención de amidas

La extracción de las amidas en *Capsicum spp.* se realizó con extracción líquida presurizada (PLE por sus siglas en inglés) a 1500 psi de presión, a partir del material seco y molido. Se utilizó primero un diseño factorial de 2^3 , es decir de 3 factores y 2 niveles, en la muestra Cahfo, a saber: disolventes metanol o acetona, temperatura de 65 °C o 90 °C, y 15 min de extracción distribuidos en 3 ciclos de 5 min o 5 ciclos de 3 min (Chanthai et al., 2012; Thomas et al., 1998).

Las 3 muestras, Cahfo, Cahpn y Cahva, fueron extraídas con las condiciones óptimas derivadas del diseño factorial, correspondientes a metanol a 90 °C y 3 ciclos de extracción de 5 min cada uno. Posteriormente se purificó el extracto añadiendo 1 volumen de agua y evaporando el metanol en el rotavapor, la fase acuosa se extrajo con cloroformo y se conservó la fase orgánica, que luego se lleva a sequedad en el rotavapor.

En *Piper nigrum*, la extracción por PLE parte del material molido. El diseño factorial 2^3 de 3 factores y 2 niveles se realiza con la muestra Pnien, y las condiciones utilizadas corresponden a metanol o acetato de etilo como disolventes, la temperatura en 25 °C o 70 °C, y 30 min totales de extracción distribuidos en 2 ciclos de 15 min o 5 ciclos de 6 min (Lee et al., 2010; Scott et al., 2005).

Las mejores condiciones se aplicaron a las 3 muestras: Pnidi, Pnien y Pnife, las cuales corresponden a la extracción con acetato de etilo a 25 °C en 5 ciclos de 6 min cada uno. A estos extractos se les realizó 3 lavados con agua destilada, y la fase orgánica se rotavaporó a sequedad.

2.2.3 Caracterización de los extractos de amidas a través de UHPLC-HRMS

Tanto en las muestras de Chile y como de pimienta, las mediciones fueron realizadas utilizando un equipo UPLC-Q-TOF Waters con cromatógrafo Aquity H Class acoplado al detector Xevo G2-XS QTOF. La ionización química se realizó con el voltaje del capilar en 2 kV, cono de entrada a 20 eV, temperatura de la fuente a 150 °C, temperatura de desolvatación en 450 °C, flujo de gas en el cono en 0 L/h y el flujo de desolvatación en 900 L/h. La detección se realizó en modo positivo en el rango 100-1000 m/z, con tasa de escaneo de 0.5 s y fragmentación en modo de Adquisición Independiente de Datos (IDA por sus siglas en inglés) con rampa de energía de colisión de 20 V a 30 V. La calibración del equipo se realizó en el rango de masa con formiato de sodio, y se utilizó encefalina leucina como referencia interna medida cada 30 s durante la cromatografía. Los resultados fueron procesados en el programa MassLynx V4.2 de Waters.

1 µL de la muestra a 10 mg/mL de concentración se inyectó en una columna Phenomenex Luna C18(2) (150 x 4.6 mm, 5 µm) a 30°C, realizando la elución con agua y ácido fórmico al 0.1% (solvente A), metanol con ácido fórmico al 0.1% (solvente B) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (solvente C) a un flujo de 0.5 mL/min. Para *C. spp.* se utilizó un gradiente que inicia con 56% B durante 5 min, incrementa hasta 100% durante 15 min y se mantiene constante por 8 min. En el caso de *P. nigrum*, el gradiente inicia con 40% C e incrementa hasta 100% C a los 30 min, manteniéndose constante por 7 min.

2.2.4 Cuantificación de las amidas por UHPLC-DAD

El análisis por UHPLC-DAD se realizó con un equipo Dionex Ultimate 3000 con detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific MSQ Plus.

En *C. annuum*, la ionización química se realizó en modo positivo con el capilar a 600 °C y 3 kV de voltaje, 80 V de voltaje en el cono y nitrógeno a 75 psi de presión. La detección se realizó en el rango 100-400 m/z con tiempo de escaneo de 0.30 s. Se inyectan 10 µL de la muestra a 10

mg/mL en una columna Phenomenex Synergi Polar-RP (150 x 4.6 mm, 4 μ m), eluyendo a 1.0 mL/min con agua y ácido fórmico 0.1% (A), y metanol con ácido fórmico 0.1% (B), en un gradiente que inicia con 66% B, incrementa a 70% B en 5 min y luego hasta 100% B en 6 min, donde se mantiene constante por 4 min. Los picos se identifican según su masa nominal $[M+H]^+$, y se integran a 280 nm.

La curva de calibración con capsaicina (USP, 94.1%) se realizó con el mismo método anterior, con concentraciones en el rango 5-1900 ppm. Se integraron las áreas de la capsaicina a 280 nm y se graficaron respecto a la concentración, con lo que se obtuvo la ecuación de interpolación $Y = 3.6 \times 10^4 + 5153 * X$ (LD = 38 ppm y LC = 127 ppm). De los patrones anteriores se extrae un set de datos en el rango 10-50 ppm, con el que se obtiene una nueva ecuación $Y = 2.7 \times 10^3 + 6.30 \times 10^3 * X$ (LD = 7 ppm y LQ = 24 ppm) que se utiliza en los picos con menor área.

Para *P. nigrum*, la detección en el espectrómetro de masas se realizó en modo positivo con el voltaje de cono en 80 V, el capilar a 500 °C y 3 kV de voltaje, y el gas nitrógeno a 75 psi. La detección se realiza en el rango 100-500 m/z, con 0.50 s de tiempo de escaneo. 10 μ L de la muestra, en concentración 10 mg/mL, se inyectan en una columna Phenomenex Synergi Polar-RP (4.6 x 150 mm, 4 μ m) y se eluye a 0.8 mL/min con agua y ácido fórmico 0.1% (A), y acetonitrilo con ácido fórmico 0.1% (B), aplicando un gradiente de 40% B a 70% B en 17 min, hasta 100% B en 7 min y constante por 3 min adicionales. La masa nominal del ion molecular $[M+H]^+$ permite identificar los picos, que luego se integran a 260 nm o 340 nm en el caso de que posean un máximo de absorbancia a esta última longitud de onda.

La cuantificación se realizó por interpolación en una curva de piperina (Sigma-Aldrich, 97%) realizada en el rango 10-1000 ppm utilizando el mismo método que las muestras de *P. nigrum*. Se integró del área a 340 nm y a 260 nm, y se graficó contra la concentración de piperina. La piperilina, piperina, piperlongumina y piperetina tienen un máximo de absorbancia a 340 nm, por lo que se interpolan sus áreas en la curva de piperina a 340 nm con ecuación $Y = 1.25 \times 10^5 + 4.213 \times 10^4 * X$ (LD = 18 ppm, LC = 58 ppm); mientras los demás compuestos identificados se cuantifican por interpolación en la curva de piperina obtenida a 260 nm con ecuación $Y = -2.10 \times 10^5 + 1.687 \times 10^4 * X$ (LD = 42 ppm, LC = 140 ppm).

2.2.5 Análisis de perfil de compuestos de pimienta por HPTLC

Se realizó la extracción de las muestras Pnidi y Pnien según lo indicado en el método estandarizado por el Atlas Internacional para la Identificación de Medicamentos Herbales (HPTLC Association, 2018). A saber, se preparó una disolución 100 mg/mL de la muestra seca y molida en metanol, se colocó en ultrasonido por 10 min y se centrifugó para obtener el sobrenadante. 7 μ L de la disolución se aplican sobre placas de cromatografía de capa delgada de alta resolución (HPTLC por sus siglas en inglés) Si 60 F₂₅₄ 20x10 cm (Merck Millipore) en una banda de 8.0 mm de longitud a 20 mm del borde inferior. Como referencia se utilizan 3 μ L de piperina 0.9 mg/mL y 3 μ L de borneol 0.2 mg/mL.

La elución se realizó con 20 mL de ciclohexano: acetato de etilo 5:3 en una cámara saturada por 20 min y 33% de humedad, dejando subir el solvente hasta 70 mm desde el borde inferior.

La placa fue derivatizada por nebulización con disolución de anisaldehído, preparada a partir de 85 mL de metanol, 10 mL de ácido acético glacial, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 mL de anisaldehído. Posterior a la nebulización, se calentó a 100 °C por 3 min. El revelado de la placa se realizó con luz blanca, 254 nm y 366 nm previo a la derivatización, y posterior a la misma se reveló con luz blanca y 366 nm.

Para la cuantificación de piperina, se utilizó el extracto obtenido previamente en dilución 1:20, y se preparó una curva de piperina de 0.05-0.25 mg/mL, con aplicación de 2 μ L tanto de la muestra como de los estándares. El pico de piperina a $R_f = 0.16$ se integra por perfil de pico en luz de 254 nm, y por densitometría a 330 nm, y se cuantifica por interpolación en la curva de piperina.

2.2.6 Purificación y aislamiento de amidas

2.2.6.1 Cromatografía semipreparativa de amidas de Chile

30 g de Cahva se extrajeron siguiendo el método descrito en la sección 2.2.2. El extracto seco se redisolvió en metanol para obtener una concentración de 300 mg/mL. La disolución se separó por HPLC semipreparativo utilizando un equipo Agilent Infinity1260 con bomba cuaternaria y detector DAD, utilizando una columna Phenomenex Synergi Polar-RP 80A (150 x 10 mm, 4 μ m) y flujo de 4.5 mL/min que utiliza agua (A) y metanol (B) en un gradiente de 66% B en 0-3 min, 50% a los 5 min que se mantiene constante hasta los 6.5 min, 66% B a los 8 min y constante hasta los 13 min, 100% B a los 14 min y constante hasta los 18 min. La recolección de las fracciones se realizó manualmente según el cromatograma DAD, separando los picos con las áreas más significativas.

Posteriormente las fracciones recolectadas se caracterizaron por UHPLC-DAD-MS con el método descrito en la sección 2.2.4, y se complementó con análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) con experimentos de ^1H y ^{13}C medidos en cloroformo deuterado (CDCl_3), obtenidos en un equipo Bruker de 400 MHz.

2.2.6.2 Obtención de piperina

Se extrajeron 14.65 g de la muestra Pnien con el mismo procedimiento descrito en la sección 2.2.2. El extracto seco obtenido se recrystalizó disolviendo primero en éter etílico frío y evaporando a sequedad en el rotavapor a 20 °C, posteriormente se adicionan 3 mL de éter etílico frío y se agita en baño de hielo (Shingate et al., 2013). El sólido remanente se separa por filtración, y se comprueba que está enriquecido con piperina mediante cromatografía de capa delgada (TLC por sus siglas en inglés) con placas de sílica gel 60 con indicador F_{254} (Merck Millipore), eluyendo con hexano: acetona 2:3.

El sólido anterior se sometió a una purificación posterior por cromatografía de columna (25 x 2.5 cm), preparada con sílica gel 60 Å 70-230 mesh (Sigma-Aldrich), aplicando la muestra

en una cabeza de columna, y eluyendo con un gradiente que incluye 2 volúmenes de hexano: acetona 2:1, 1 volumen de hexano acetona 1:1, 4 volúmenes de hexano: acetona 2:3, 2 volúmenes de hexano: acetona 1:4 y finalmente 2 volúmenes de acetona pura. Se recogieron fracciones de 10 mL, y se analizaron por TLC con las mismas condiciones descritas anteriormente. Las fracciones 10-14 presentaron una mancha correspondiente a la piperina, por lo que se unieron y se llevaron a sequedad en el rotavapor. La piperina purificada se analizó por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN medidos en un equipo Bruker de 400 MHz, con metanol deuterado (CD_3OD) como disolvente.

2.2.6.3 Cromatografía semipreparativa y obtención de la guineensina

Se extrajeron 20 g de la muestra Pnien con el mismo procedimiento de extracción descrito para las piperamidas en la sección 2.2.2. Se obtuvieron 1.7028 g de extracto seco, del cual se redisolvió 1.00 g en metanol para obtener una concentración de 100 mg/mL. La disolución se separó por HPLC semipreparativo utilizando un equipo Agilent Infinity1260 con columna Phenomenex Synergi Polar-RP 80A (150 x 10 mm, 4 μm), eluyendo con flujo de 3.8 mL/min y un gradiente de agua (A) y acetonitrilo (B) que inicia con 50% B, incrementa a 62.4% B a los 7 min, 70% B a los 13 min y 80% B a los 20 min. La recolección de las fracciones se realizó manualmente según el cromatograma DAD, separando el pico correspondiente a guineensina y otros picos de con área semejante.

La identificación de la guineensina y las demás fracciones se realizó con UHPLC-DAD-MS con el método descrito en la sección 2.2.4, y se complementó con ^1H -RMN y ^{13}C -RMN medidos en un equipo Bruker de 400 MHz, medidos en CDCl_3 .

2.2.7 Proceso de extracción para obtención de polifenoles

Para las muestras de chile, se realizó un primer procedimiento de extracción (Extr-C-1), que consiste en colocar el material seco y molido con acetona 80% en proporción 1:6 y dejar

por 30 min en ultrasonido. La mezcla se filtró y el residuo se extrajo con hidróxido de sodio 4 mol/L en proporción 1:4 con agitación por 1 h. El extracto básico se separó y acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH 2, para luego extraer con acetato de etilo (Oboh & Rocha, 2007).

Otros procedimientos de extracción (Extr-C-2, Extr-C-3) se realizaron utilizando el método de extracción líquida presurizada (PLE por sus siglas en inglés), partiendo del material seco molido y extrayendo con metanol: agua 8:2 (Extr-C-2) o metanol puro (Extr-C-3) con una presión de 1500 psi, 40°C de temperatura y 5 ciclos de 5 min de tiempo estático cada uno para un total de 25 min de tiempo total de extracción (Alvarez-Parrilla et al., 2011; Castro-Concha et al., 2014). Se repitieron las condiciones de Extr-C-3 pero variando la temperatura de extracción a 80 °C para obtener el extracto Extr-C-4 (Shan et al., 2005).

Un quinto proceso de extracción (Extr-C-5) se realizó manteniendo las condiciones de Extr-C-3 pero con un proceso de purificación que consiste en la adición de 1 volumen de agua al extracto metanólico, la evaporación del metanol en el rotavapor y el posterior lavado de la fase acuosa con éter etílico (Jeong et al., 2011).

En cuanto a las muestras de pimienta, en el primer procedimiento de extracción se utilizó el material molido en metanol: agua 8:2 con ultrasonido por 30 min. El extracto obtenido se colocó en el rotavapor para eliminar el metanol, y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo y posteriormente con *n*-butanol. Este último extracto se llevó a sequedad en el rotavapor para obtener el extracto Extr-P-1 (Bandyopadhyay et al., 1990; Chatterjee et al., 2007).

Luego se realizaron extracciones en PLE a 1500 psi y 40 °C, P-2, P-3, P-4 y P-5 variando el número de ciclos y el tiempo estático de cada uno para completar 30 min de tiempo total de extracción. El extracto Extr-P-2 se realizó con metanol: agua 8:2 y 2 ciclos de 15 min, mientras en el extracto Extr-P-3 se utilizó el mismo solvente, pero 5 ciclos de 6 min. En el extracto Extr-P-4 se cambió el disolvente a acetona: agua 1:1, manteniendo la extracción en 2 ciclos de 15 min. Un extracto adicional (Extr-P-5) se obtuvo también con acetona: agua 1:1, pero con 5 ciclos de 6 min (L. Su et al., 2007a).

Finalmente se realizó el procedimiento de Extr-P-6 con una extracción previa en PLE con hexano a 40 °C, 2 ciclos de 5 min, seguido de la extracción con las condiciones de Extr-P-5 pero aumentando la temperatura a 70 °C. El extracto obtenido se rotavaporó para eliminar la acetona y la fase acuosa se lavó con éter etílico. La fase acuosa se llevó a sequedad en el rotavapor (Giraldo Aricapa, 2012).

2.2.8 Caracterización de los extractos de polifenoles a través de UHPLC-HRMS

Las muestras, tanto de *C. annuum*. como de *P. nigrum*, fueron analizadas utilizando un sistema cromatográfico Thermo Scientific Accela con bomba binaria y detector DAD, acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL. 1 µL de la muestra se separa en una columna Thermo FisherScientific Hypersil Gold AQ C18 (200 x 2.1 mm, 1.9 µm) con flujo de 0.3 mL/min. Los disolventes utilizados corresponden a agua con ácido fórmico 0.1% (A) y acetonitrilo con ácido fórmico 0.1% (B), en gradiente de 4% B a 20% B en 20 min, hasta 35% B en 10 min, aumenta a 100% B en 1 min y se mantiene constante por 4 min adicionales. La ionización química se realizó en modo negativo, con el voltaje de nebulización en 4.8 kV, el capilar a 300 °C y 15 V, y el lente a 70 V. El rango de masa utilizado fue 100-2000 uma con intervalo de escaneo de 0.50 s. Se utilizó análisis dependiente de datos (DDA por sus siglas en inglés) para obtener la fragmentación MS² a MS⁵ a partir del ion más abundante.

2.2.9 Determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

El reactivo Folin-Ciocalteu se preparó siguiendo una adaptación del método descrito previamente (Slinkard & Singleton, 1977). El análisis se llevó a cabo con 0.500 mL del extracto obtenido en el punto 2.2.8 y redisuelto en metanol, 0.500 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 10.00 mL de disolución de carbonato de sodio 7.5%, aforando a 25.00 mL con agua destilada. Se dejó en reposo por 1 h en oscuridad, y se midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco.

Los resultados fueron interpolados en una curva de ácido gálico preparada en el rango 50-700 ppm, y se expresan como mg ácido gálico equivalente (AGE)/g de muestra.

2.2.10 Análisis de actividad antioxidante con el método de DPPH

Se realizó según un método desarrollado en el laboratorio, en el que se adicionó una alícuota de 1.00 mL del extracto polifenólico (2.2.8) a diferentes concentraciones en balones aforados de 5.00 mL, se añadieron 2.00 mL de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) 0.25 mmol/L, se aforó con metanol y se incubó en la oscuridad por 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm, y se calculó el porcentaje de inhibición de la muestra respecto a la absorbancia obtenida por el blanco. Para calcular la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se graficó el porcentaje de inhibición contra la concentración final de la muestra, y se calculó la concentración a la que se obtiene el 50% de inhibición.

2.2.11 Análisis de actividad antioxidante con el método ORAC

El análisis de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés) sigue el procedimiento adaptado a partir de (Dávalos et al., 2004). En una placa para fluorescencia de 96 pocillos se colocó el extracto polifenólico (2.2.8) en diferentes concentraciones o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) 1-8 $\mu\text{mol/L}$, con fluoresceína de sodio (concentración final 70 nmol/L). La mezcla se incubó por 15 min a 37 °C, y posteriormente se adicionó AAPH (diclorhidrato de 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida, concentración final 12 mmol/L). Todas las disoluciones se prepararon en buffer de fosfato 75 mmol/L (pH = 7.4). Se midió la fluorescencia cada minuto por 80 min, utilizando un fluorómetro Thermo Scientific Ascent Fluoroskan con filtro de excitación a 480 nm y filtro de emisión a 520 nm. Se graficó el área bajo la curva contra la concentración de muestra o Trolox y se obtuvo la ecuación de regresión lineal. Los resultados se expresan como mmol Trolox equivalente (TE)/g

de extracto, obtenido al dividir la pendiente de la ecuación de la muestra entre la pendiente de la ecuación del Trolox.

2.2.12 Análisis estadístico

Los análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) unidireccional seguidos de un Tukey *post-hoc* test y los de correlaciones de Pearson fueron realizados utilizando el programa Minitab versión 20.4 (64-bit).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Extracción de amidas de chile y pimienta

Luego del procedimiento realizado con el diseño factorial para la extracción de amidas de chile, descrito en la sección 2.2.2 de la metodología, utilizando un equipo Dionex de extracción líquida presurizada (PLE por sus siglas en inglés), se determinó la eficiencia de la extracción a través de la cuantificación de la amida principal capsaicina por UPLC-DAD, con base en la curva de calibración elaborada según lo descrito en dicha sección e ilustrada en la Figura 9.

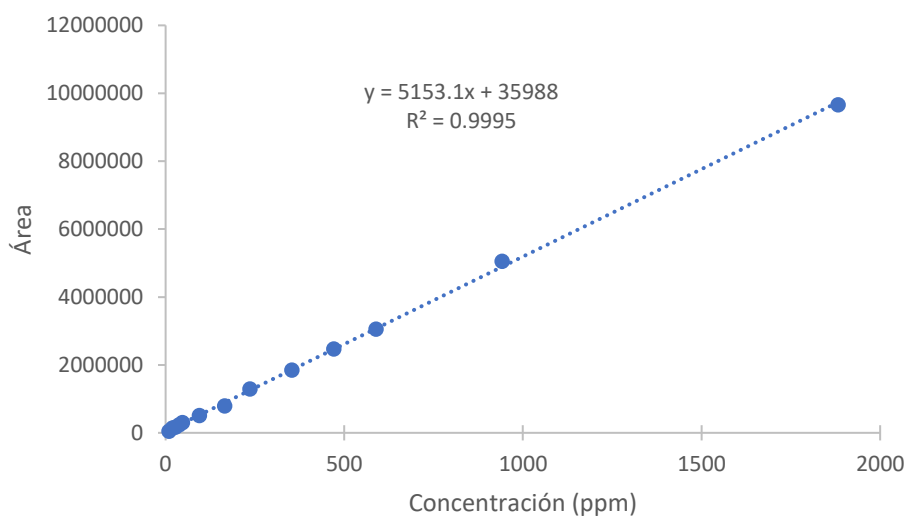


Figura 9. Curva de calibración de la capsaicina a través de cuantificación por UPLC-DAD a 282 nm.

De esta forma, las amidas se cuantificaron contra una curva de calibración lineal de capsaicina elaborada en el rango de 10-1900 ppm, con la ecuación $Y = 3.6 \cdot 10^4 + 5153 \cdot X$, con límite de detección (LD) para la interpolación de 38 ppm, y límite de cuantificación (LC) de 127 ppm.

Este diseño factorial con la utilización de PLE fue desarrollado con base en condiciones aplicadas previamente para la extracción de capsaicina de productos alimentarios (Chanthai et al., 2012; Thomas et al., 1998). Los factores que se consideraron incluían dos diferentes condiciones de temperatura (65 y 90 °C), dos diferentes solventes (acetona y metanol), y utilizando 3 y 5 ciclos de extracción con tiempos estáticos de 5 y 3 min respectivamente, de forma a completar un total de 15 minutos de tiempo de extracción en cada experimento. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro II.

Cuadro II. Condiciones y resultados de las extracciones de amidas en el diseño factorial de *C. annum*.

Extracción	Condiciones	Masa muestra seca (g)	Capsaicina (mg/g seca)
Cahfo-dfc-1	MeOH, 90°C 5 ciclos x 3 min	1.0082	1.83
Cahfo-dfc-2	MeOH, 65°C 5 ciclos x 3 min	0.9999	1.58
Cahfo-dfc-3	Acetona, 65°C 5 ciclos x 3 min	1.0009	0.71
Cahfo-dfc-4	Acetona, 90°C 5 ciclos x 3 min	1.0111	1.54
Cahfo-dfc-5	MeOH, 65°C 3 ciclos x 5 min	1.0014	1.26
Cahfo-dfc-6	Acetona, 65°C 3 ciclos x 5 min	1.0006	1.12
Cahfo-dfc-7	MeOH, 90°C 3 ciclos x 5 min	1.0130	1.91
Cahfo-dfc-8	Acetona, 90°C 3 ciclos x 5 min	1.0023	1.26

De forma similar, en el diseño factorial de *P. nigrum* (sección 2.2.2) se determinó la eficiencia de la extracción a través de la cuantificación de la amida principal piperina utilizando el método UPLC-DAD descrito en la sección 2.2.4, y con base en la curva de calibración elaborada e ilustrada en la Figura 10.

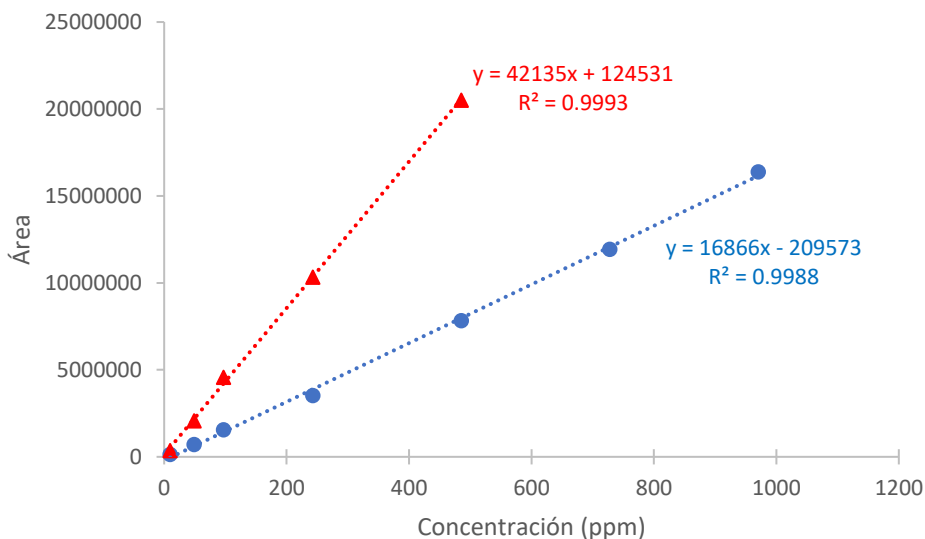


Figura 10. Curvas de calibración de la piperina a través de cuantificación por UPLC-DAD, a 280 nm (●) y 340 nm (▲).

Para la piperilina, piperina, piperlongumina y piperetina, se realiza la cuantificación a 340 nm con una curva de piperina con ecuación $Y = 1.25 \cdot 10^5 + 4.213 \cdot 10^4 \cdot X$, cuyos valores de LD y LC son, respectivamente, 18 ppm y 58 ppm. Para los demás compuestos, la cuantificación se realizó a 260 nm con una curva de piperina de ecuación $Y = -2.10 \cdot 10^5 + 1.687 \cdot 10^4 \cdot X$, con valores LD de 42 ppm y LC de 140 ppm.

En este caso también el diseño factorial con la utilización de PLE fue desarrollado con base en condiciones aplicadas previamente para la extracción de piperina de productos alimentarios (Lee et al., 2010; Scott et al., 2005). Los factores que se consideraron incluían dos diferentes condiciones de temperatura (25 y 70 °C), dos diferentes solventes (acetato de etilo y

metanol), y la utilización de 2 y 5 ciclos de extracción con tiempos estáticos de 15 y 6 min respectivamente, de forma a completar un total de 30 minutos de tiempo de extracción en cada experimento. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro III.

Cuadro III. Condiciones y resultados de las extracciones de amidas en el diseño factorial de *P. nigrum*.

Extracción	Condiciones	Masa muestra seca (g)	Piperina (mg/100 g)
<i>Pnien-dfp-1</i>	MeOH, 25°C 2 cycles x 15 min	2.0009	173.9
<i>Pnien-dfp-2</i>	MeOH, 70°C 5 cycles x 6 min	1.9999	1878.5
<i>Pnien-dfp-3</i>	MeOH, 25°C 5 cycles x 6 min	2.0000	897.8
<i>Pnien-dfp-4</i>	AcOEt, 25°C 2 cycles x 15 min	2.0001	1653.3
<i>Pnien-dfp-5</i>	MeOH, 70°C 2 cycles x 15 min	2.0002	872.9
<i>Pnien-dfp-6</i>	AcOEt, 70°C 5 cycles x 6 min	1.9998	1887.6
<i>Pnien-dfp-7</i>	AcOEt, 70°C 2 cycles x 15 min	2.0000	516.6
<i>Pnien-dfp-8</i>	AcOEt, 25°C 5 cycles x 6 min	2.0000	1063.4

3.2 Caracterización de amidas de chile y pimienta

El análisis de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos para los extractos de chile según el proceso de UPLC-QTOF-ESI MS descrito en la sección 2.2.3 de la metodología,

permitió la identificación de las doce amidas cuya información se resumen en el Cuadro IV y los cromatogramas se encuentran en la Figura 11.

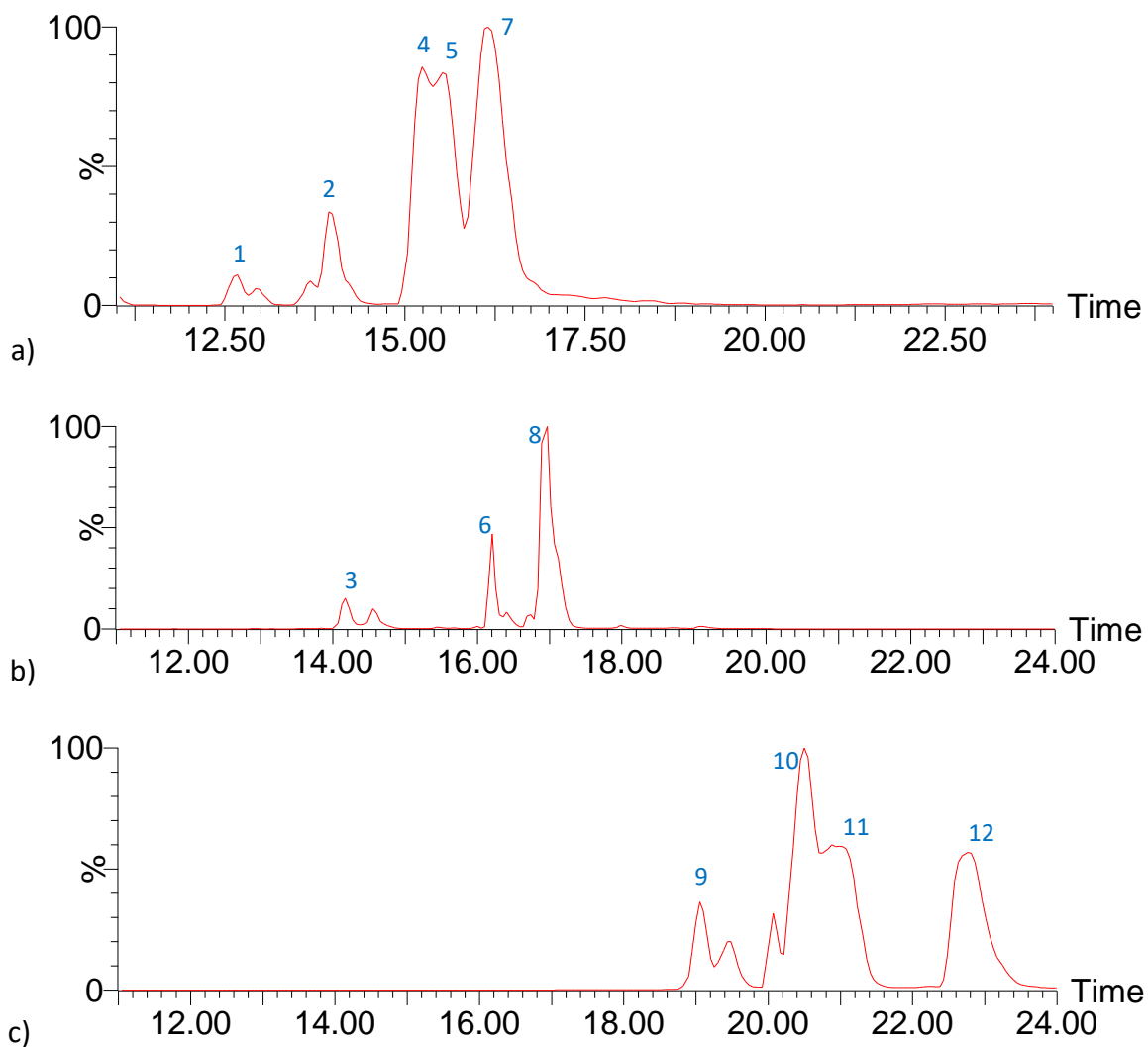


Figura 11. Cromatograma de extracción de iones (XIC) del análisis UPLC-Q-TOF para los picos:

a) 1, 2, 4, 5 y 7; b) 3, 6 y 8; c) 9, 10, 11 y 12, del extracto de *C. annuum*.

Cuadro IV. Identificación de amidas en *C. annuum* por UHPLC-Q-TOF.

N°	Identificación	t _R (min)	[M+H] ⁺	Fórmula molecular	Error (ppm)	MS ²
1	Nornorcapsaicina	12.82	278.1759	C ₁₆ H ₂₄ NO ₃	1.01	137
2	Nornordihidrocapsaicina	13.94	280.1936	C ₁₆ H ₂₆ NO ₃	8.32	177, 137, 145, 122
3	Norcapsaicina	14.22	292.1906	C ₁₇ H ₂₆ NO ₃	-2.29	137
4	Nordihidrocapsaicina	15.04	294.2092	C ₁₇ H ₂₈ NO ₃	7.75	201, 137, 122
5	Capsaicina	15.20	306.2093	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	7.78	182, 171, 153, 137, 122
6	Homocapsaicina I/II	16.20	320.2231	C ₁₉ H ₃₀ NO ₃	1.66	184, 137
7	Dihidrocapsaicina	16.25	308.2255	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	9.51	184, 172, 137, 122
8	Homodihidrocapsaicina I/II	16.97	322.2371	C ₁₉ H ₃₂ NO ₃	-3.47	198, 186, 137
9	9-octadecenamida (oleamida)	19.05	282.2805	C ₁₈ H ₃₆ NO	2.87	265, 263, 247, 201, 179, 133
10	Capsiamida	20.22	270.2822	C ₁₇ H ₃₆ NO	9.29	177, 137, 145, 122
11	Octadecanamida	20.98	284.2957	C ₁₈ H ₃₈ NO	1.27	137
12	13-docosenamida	22.76	338.3461	C ₂₂ H ₄₄ NO	9.26	321, 313, 303, 289, 179

Por otro lado, el análisis de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos para los extractos de pimienta según el proceso de UPLC-QTOF-ESI MS descrito en la sección 2.2.3 de la metodología, permitió la identificación de las 31 amidas mostradas en los cromatogramas de la Figura 12, cuya información se resumen en el Cuadro V.

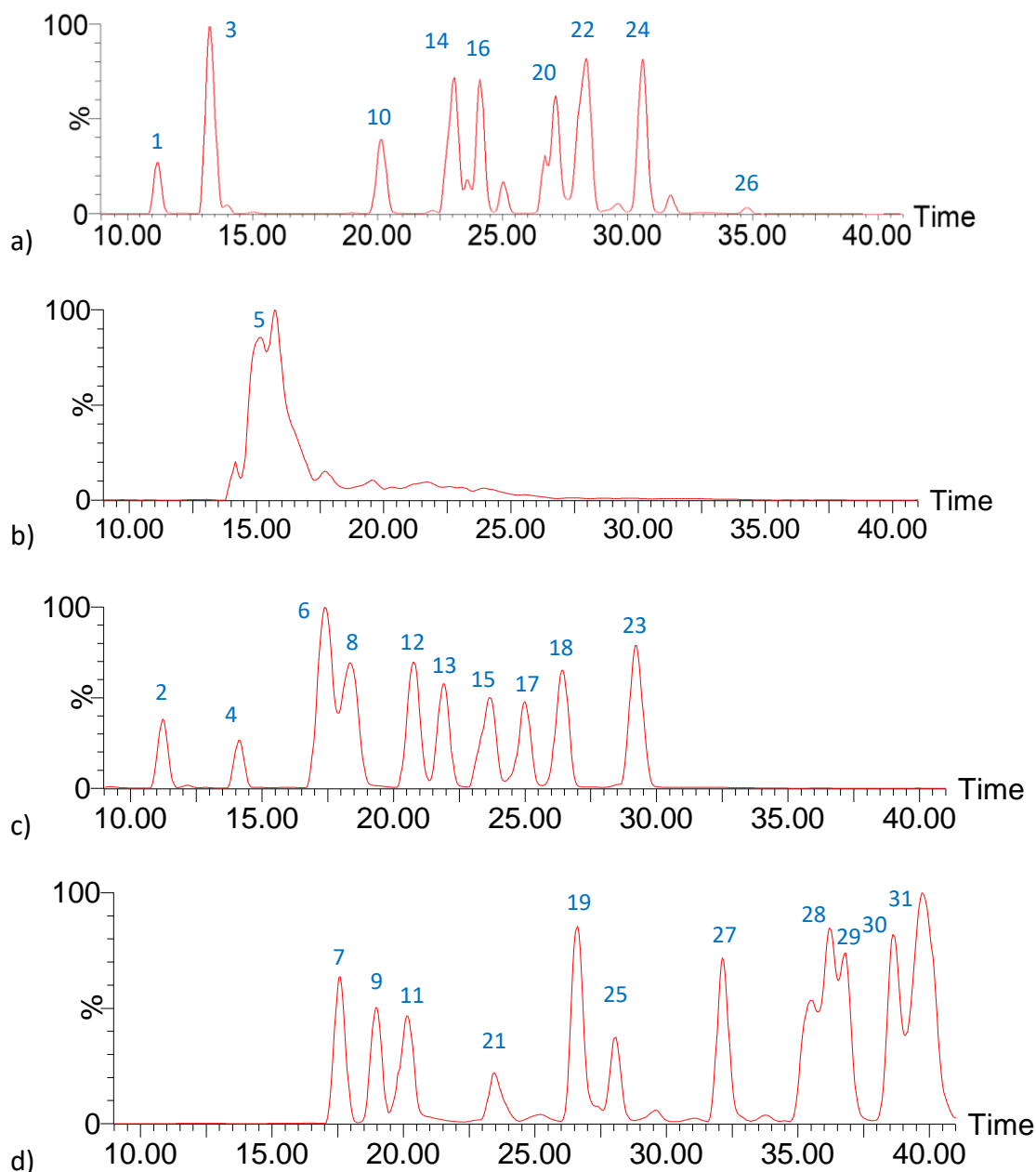


Figura 12. Cromatograma de extracción de iones XIC del análisis UPLC-Q-TOF de extractos de *P. nigrum*, separado en grupos (a-d) para facilitar su visualización.

Cuadro V. Identificación de amidas en *P. nigrum* por UHPLC-Q-TOF.

N°	Identificación	tR (min)	m/z [M+H] ⁺	Aductos observados	Fórmula (M+H)	Error (ppm)	MS ²
1	Piperlonguminina	11.17	274.1420	M+H, M+Na	C ₁₆ H ₂₀ NO ₃	-8.46	201, 173, 135
2	Piperilina	11.33	272.1327	M+H, M+Na, 2M+Na	C ₁₆ H ₁₈ NO ₃	4.81	201, 171, 159, 143, 135
3	Dihidropiperlonguminina	13.26	276.1586	M+H	C ₁₆ H ₂₂ NO ₃	-4.96	173, 145, 135
4	Piperanina	14.12	288.1602	M+H, M+Na	C ₁₇ H ₂₂ NO ₃	0.80	203, 201, 175, 161, 152, 145, 135
5	Piperina	14.32	286.1273	M+H, M+Na, 2M+H	C ₁₇ H ₂₀ NO ₃	-9.48	201, 171, 159, 143, 135, 115
6	Piperdardina	17.22	314.1794	M+H, M+Na, 2M+H	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	2.04	227, 199, 169, 161, 141, 131, 115
7	(2E,4E,8E)-Piperamida- C9:3	17.53	326.1804	M+H, M+Na, 2M+H	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	4.66	227, 197, 169, 141, 135, 131
8	Piperetina	18.44	312.1655	M+H, M+Na, 2M+H, 2M+Na	C ₁₉ H ₂₂ NO ₃	17.72	227, 197, 169, 141
9	Retrofractamida A	18.90	328.1944	M+H, M+Na	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	9.54	255, 227, 161, 135
10	Pipercallosina	20.07	330.2108	M+H, M+Na	C ₂₀ H ₂₈ NO ₃	1.75	229, 201, 135

N°	Identificación	tR (min)	m/z [M+H] ⁺	Aduetos observados	Fórmula (M+H)	Error (ppm)	MS ²
11	Pellitorina	20.17	224.2015	M+H	C ₁₄ H ₂₆ NO	0.27	208, 168, 154
12	Dehidropiperonalina	20.65	340.1971	M+H, M+Na, 2M+H, 2M+Na	C ₂₁ H ₂₆ NO ₃	7.14	255, 227, 179, 164, 161, 138, 135, 131
13	Piperonalina	21.90	342.2122	M+H, M+Na, 2M+H	C ₂₁ H ₂₈ NO ₃	5.43	229, 227, 199, 161, 135, 131
14	Retrofractamida B	22.86	356.2261	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₃₀ NO ₃	9.91	283, 255, 234, 215, 185, 173, 161, 135
15	Piperoleína B	23.45	344.2272	M+H, M+Na	C ₂₁ H ₃₀ NO ₃	3.45	222, 201, 135
16	Piperchabamida D	24.13	358.2411	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₃₂ NO ₃	8.04	285, 227, 135
17	Piperundecalidina	24.97	368.2231	M+H, M+Na	C ₂₃ H ₃₀ NO ₃	1.44	255, 135
18	Piperchabamida B	26.39	370.2446	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₃₂ NO ₃	8.72	285, 161, 135
19	Brachiamida A	26.54	382.2458	M+H, M+Na	C ₂₄ H ₃₂ NO ₃	9.83	311, 283, 187, 161, 135, 131
20	Guineensina	26.95	384.2591	M+H, M+Na	C ₂₄ H ₃₄ NO ₃	3.61	311, 283, 187, 175, 161, 135
21	Piperflaviflorina A	27.99	386.2699	M+H, M+Na	C ₂₄ H ₃₆ NO ₃	0.99	313, 135
22	Piperflaviflorina B	28.35	398.2727	M+H, M+Na	C ₂₅ H ₃₆ NO ₃	7.99	311, 283, 161, 135
23	Piperchabamida C	29.09	396.2575	M+H, M+Na	C ₂₅ H ₃₄ NO ₃	9.16	311, 283, 161, 135

N°	Identificación	tR (min)	m/z [M+H] ⁺	Aductos observados	Fórmula (M+H)	Error (ppm)	MS ²
24	Brachistamida B	30.49	412.2857	M+H, M+Na	C ₂₆ H ₃₈ NO ₃	1.29	339, 311, 175, 161, 135
25	1-(octadeca-2E,4E,12/13Z-trienoil)pirrolidina	32.14	332.2957	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₃₈ NO	1.08	268, 261, 233 201, 135
26	Brachistamida D	34.75	426.3001	M+H	C ₂₇ H ₄₀ NO ₃	-1.69	135
27	(2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida	35.18	334.3147	M+H	C ₂₂ H ₄₀ NO	1.10	306, 278, 261, 186, 154
28	1-(octadeca-2E,4E,12/13Z-trienoil)pirrolidina	36.20	332.2957	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₃₈ NO	1.08	304, 261, 233, 201, 153
29	(2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida	36.76	336.3070	M+H, M+Na	C ₂₂ H ₄₂ NO	-8.40	320, 280, 279, 263, 201, 172, 153
30	1-(octadeca-2E,4E,13Z-trienoil)piperidina	38.56	346.3136	M+H, M+Na	C ₂₃ H ₄₀ NO	7.54	318, 279, 261, 201, 153
31	(2E,4E,14Z)-N-Isobutil-2,4,14-eicosatrienamida	39.92	362.3423	M+H	C ₂₄ H ₄₄ NO	0.03	306, 289, 154

3.3 Cuantificación de amidas de chile y pimienta

La aplicación de las mejores condiciones del diseño factorial para la extracción de amidas de las muestras de chile, mostradas en la sección 3.1., permitió obtener los rendimientos que se resumen en el Cuadro VI, luego de seguir el procedimiento descrito en la sección 2.2.2. de la metodología.

Cuadro VI. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de amidas de *C. annuum* con respecto a la masa de muestra seca.

Muestra	Masa muestra seca (g)	Masa extracto (g)	% rendimiento
Cahfo	7.5003	0.1946	2.595
Cahpn	2.0044	0.0471	2.350
Cahva	7.5017	0.2634	3.511

Asimismo, el Cuadro VII resume los contenidos de los principales capsaicinoides en las muestras, obtenidos por HPLC-DAD según se describe en la sección 2.2.4.

Cuadro VII. Contenido de capsaicinoides en las muestras de *C. annuum*. Valores en mg Capsaicina Equivalente/100 g muestra seca.

Compuesto	Muestra ¹		
	Cahfo	Cahpn	Cahva
Nordihidrocapsaicina	7.23 ^c ± 0.03	N.C. ²	N.C.
Capsaicina	174 ^a ± 14	161.5 ^a ± 13	350.9 ^a ± 5.7
Dihidrocapsaicina	37.8 ^b ± 2.3	46.5 ^b ± 2.6	133 ^b ± 10
Total	219	208	484

¹Diferentes letras en los superíndices en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey *post-hoc* test.

²N.C.: No cuantificable.

Por otro lado, la aplicación de las mejores condiciones del diseño factorial para la extracción de amidas de las muestras de pimienta, descritas en la sección 3.1, permitió obtener los rendimientos que se resumen en el Cuadro VIII, luego de seguir el procedimiento descrito en la sección 2.2.4 de la metodología.

Cuadro VIII. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de amidas de *P. nigrum*.

Muestra	Masa muestra seca (g)	Masa extracto (g)	% rendimiento
Pnien	10.0000	0.6313	6.31
Pnife	10.0000	0.5137	5.14
Pnidi	9.9999	0.5712	5.71

El Cuadro IX resume los contenidos de las principales piperamidas en las muestras.

Cuadro IX. Contenido de piperamidas en las muestras de *P. nigrum*. Valores en mg Piperina Equivalente/100 g muestra seca.

Compuesto	Muestra ¹		
	Pnidi	Pnien	Pnife
Piperilina	79.8 ^{h,i} ± 1.0	137.3 ^{e,f} ± 4.7	84 ^g ± 3.4
Piperlonguminina	48 ⁱ ± 0.6	80.8 ^f ± 3.8	70.4 ^g ± 4.4
Piperanina	N.C. ²	116.2 ^f ± 2.9	72.6 ^g ± 1.8
Piperina ³	2759 ^a ± 107	4514 ^a ± 94	2612 ^a ± 153
Pellitorina	414.4 ^c ± 5.2	725 ^b ± 35	570 ^c ± 38
Piperetina	178.1 ^{f,g} ± 1.9	185.9 ^e ± 5.9	119.6 ^{f,g} ± 2.1
(2E,4E,8E)-Piperamida-C9:3	105.7 ^{h,i} ± 1.3	141.5 ^{e,f} ± 4.4	121 ^{f,g} ± 10
Retrofractamida A	N.C.	84.8 ^f ± 6.3	82.9 ^g ± 2.7
Dehidropiperonalina	123.3 ^{g,h} ± 1.1	201.5 ^e ± 5.7	165 ^{e,f,g} ± 7.0
Retrofractamida B	169 ^{f,g} ± 11	294.3 ^d ± 7.0	225 ^{e,f} ± 7.3
Piperoleína B	N.C.	98.1 ^f ± 2.8	71.8 ^g ± 4.9
Guineensina	276.5 ^d ± 3.6	421 ^c ± 26	378.8 ^d ± 7.1
(2E,4E,13Z)-N-isobutil-octadeca-2,4,13-trienamida	517.3 ^b ± 6.4	754 ^b ± 60	722 ^b ± 41
N-isobutil-2E,4E-octadecadienamida	189 ^{e,f} ± 14	315 ^d ± 11	264 ^{d,e} ± 23
1-(octadeca-2E,4E,12Z-trienil)piperidina	249.3 ^{d,e} ± 2.9	445 ^c ± 24	374 ^d ± 25
Total	5109	8514	5933

¹Diferentes letras en los superíndices en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey *post-hoc* test

²N.C.: No cuantificable.

³Piperina: Cuantificada a partir de una dilución 1:5.

3.4 Perfil de componentes de pimienta por HPTLC

En HPTLC, las muestras Pnidi y Pnien se analizaron por el método de la HPTLC Association y se compararon con otras muestras de *P. nigrum* provenientes de Vietnam en distintas presentaciones (negra, blanca, amarilla y roja), así como con otras especies con características visuales similares. Parte de los resultados obtenidos, según el procedimiento descrito en la sección 2.2.5 de la metodología, se ilustran en la Figura 13.

Por otro lado, el análisis por HPTLC también permitió realizar la cuantificación de piperina, en este caso realizando la dilución 1:20 de las muestras. Este análisis se realiza por interpolación en una curva de calibración de 5 puntos (0.100 – 0.500 mg/mL) (Figura 14), con detección por perfil de pico obtenido de la imagen a 254 nm, o detección por densitometría con escaneo a la longitud de onda máxima de 331 nm.

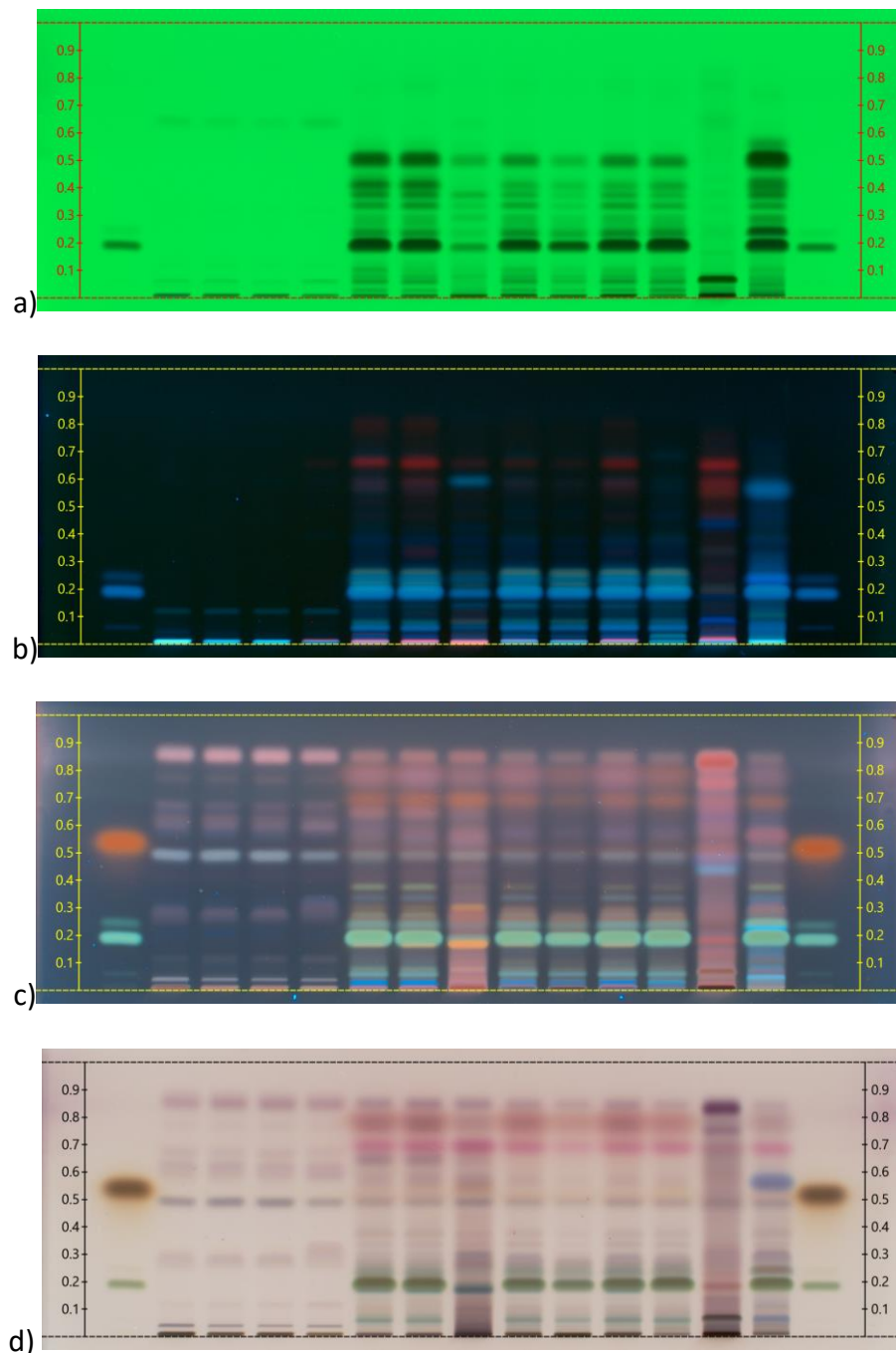


Figura 13. Análisis de las muestras Pnien (punto de aplicación 6) y Pnife (punto de aplicación 7) por HPTLC según el método de HPTLC Association. a) Revelado en luz UV a 254 nm, b) revelado en luz UV a 366 nm, c) revelado posterior a la derivatización en luz UV a 366 nm, d) revelado posterior a la derivatización en luz blanca.

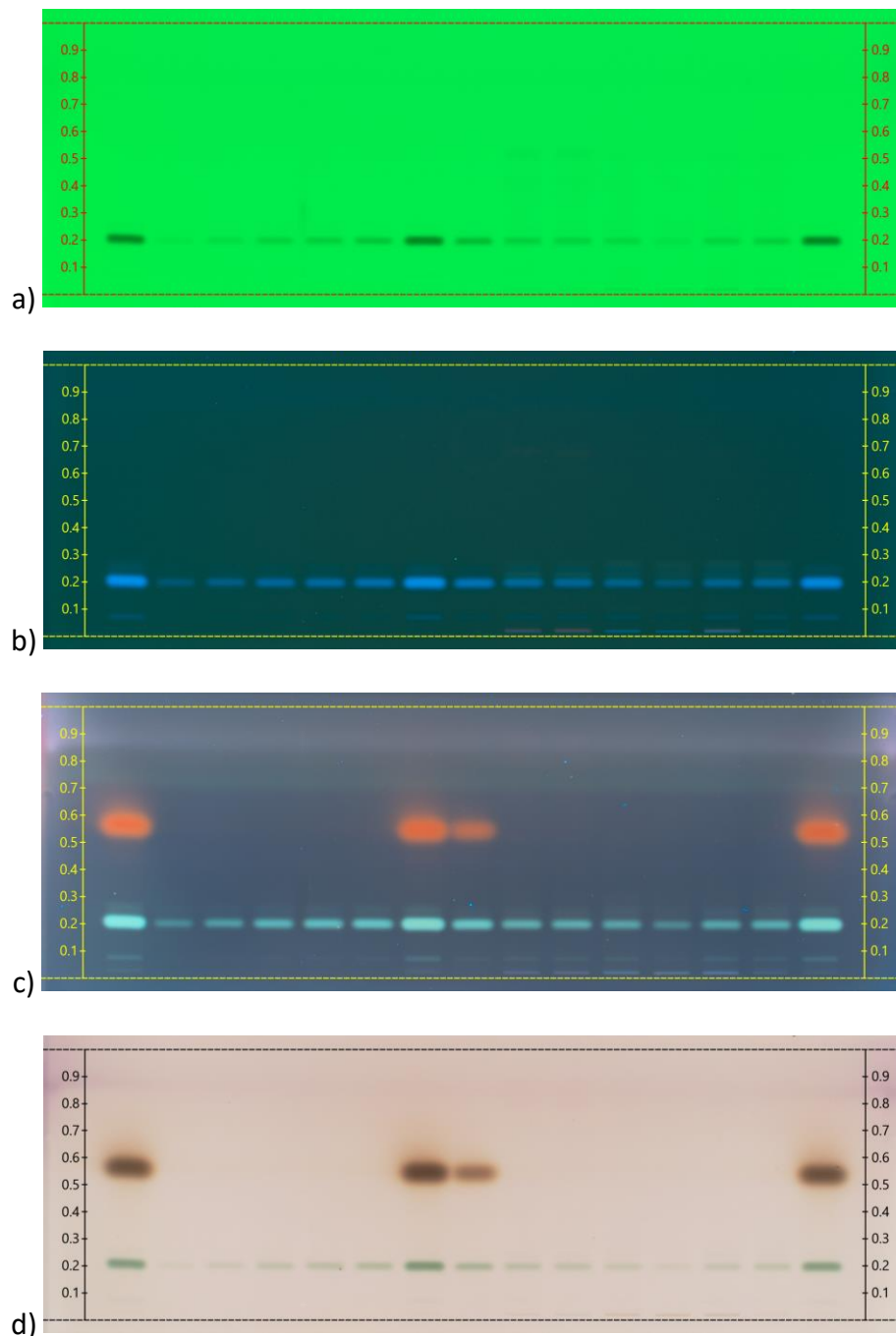


Figura 14. Análisis de las muestras Pnien (punto de aplicación 9) y Pnife (punto de aplicación 10) para cuantificación de piperina por interpolación en curva de calibración (puntos de aplicación 2-6). Revelado en a) luz UV a 254 nm, b) luz UV a 366 nm, c) posterior a la derivatización en luz UV a 366 nm, d) posterior a la derivatización en luz blanca.

Finalmente, los resultados de la cuantificación realizada se muestran en el Cuadro X, donde se observa que es más eficiente utilizar la densitometría a 331 nm.

Cuadro X. Cuantificación de piperina en las muestras de *P. nigrum*, por perfil de pico de imagen a 254 nm, y por densitometría a 331 nm.

Muestra	Concentración de piperina	
	Perfil de pico (254 nm)	Densitometría (331 nm)
Pimienta negra (Pnien)	0.181 mg/mL	0.227 mg/mL
Pimienta negra (Pnife)	0.168 mg/mL	0.197 mg/mL
Pimienta negra (Vietnam)	0.141 mg/mL	0.144 mg/mL
Pimienta blanca (Vietnam)	0.179 mg/mL	0.180 mg/mL
Pimienta roja (Vietnam)	0.064 mg/mL	0.065 mg/mL
Pimienta amarilla (Vietnam)	0.125 mg/mL	0.125 mg/mL

3.5 Obtención de piperina

La disolución de un extracto de piperamidas preparado como se describe en la sección 2.2.2, se separó por cromatografía de columna utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.2.6.2. La piperina obtenida fue identificada según los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C que se muestran a continuación en la Figura 15.

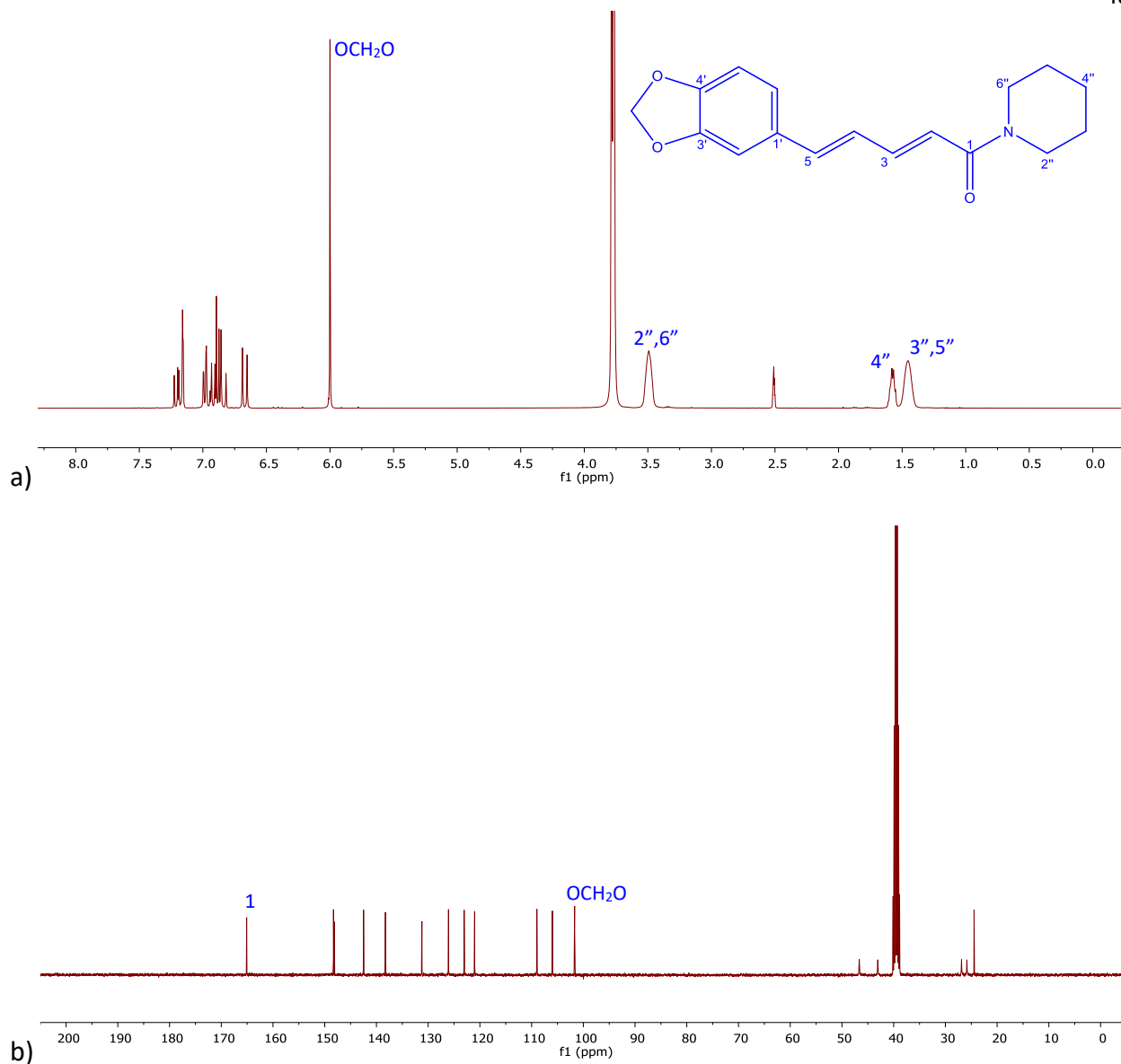


Figura 15. Espectros: a) ^1H -RMN (400 MHz) b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la piperina aislada, en CD_3OD .

Asimismo, el Cuadro XI resume los desplazamientos de las señales de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C de la piperina aislada.

Cuadro XI. Desplazamientos y asignación de las señales de RMN (CD₃OD) de la piperina aislada.

#C	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)
1	165.0	
2	121.1	6.66 (d, J=14.6 Hz)
3	142.4	7.19 (dd, J=14.5, 10.5 Hz)
4	126.2	6.92 (dd, J=15.5, 10.6 Hz)
5	138.4	6.84 (d, J=15.6 Hz)
1'	131.3	
2'	106.1	7.15 (d, J=1.9 Hz)
3', 4'	148.1	
5'	109.0	6.88 (d, J=8.0 Hz)
6'	123.1	6.97 (dd, J=8.2, 1.8 Hz)
O-CH ₂ -O	101.6	5.99 (s)
2''	43.3	3.49 (m)
3''	25.8	1.46 (m)
4''	24.3	1.56 (q, J=6.2 Hz)
5''	27.0	1.46 (m)
6''	46.7	3.49 (m)

3.6 Fraccionamiento del extracto de *P. nigrum* y aislamiento de la guineensina

La disolución de un extracto de piperamidas (2.2.2), se separó por cromatografía HPLC semipreparativa utilizando un equipo Agilent Infinity 1260 con detector DAD, según lo descrito en la sección 2.2.6.3. Se recogieron diez fracciones, cuyas masas se resumen en el Cuadro XII, las que fueron evaporadas a sequedad y luego analizadas por UHPLC-ESI/MS y RMN.

Cuadro XII. Rendimientos obtenidos en el fraccionamiento semipreparativo del extracto de *P. nigrum*.

Fracción	Masa (mg)
1	11.4
2	9.0
3	51.7
4	64.3
5	41.1
6	12.8
7	12.1
8	34.0
9	16.6
10	22.4

De este proceso, se logran obtener dos fracciones con compuestos altamente puros. En primer lugar, la guineensina, en la fracción 6, y la (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-octadecadienamida, aislada en la fracción 9, como lo muestran los cromatogramas obtenidos para ambas fracciones (Figura 16).

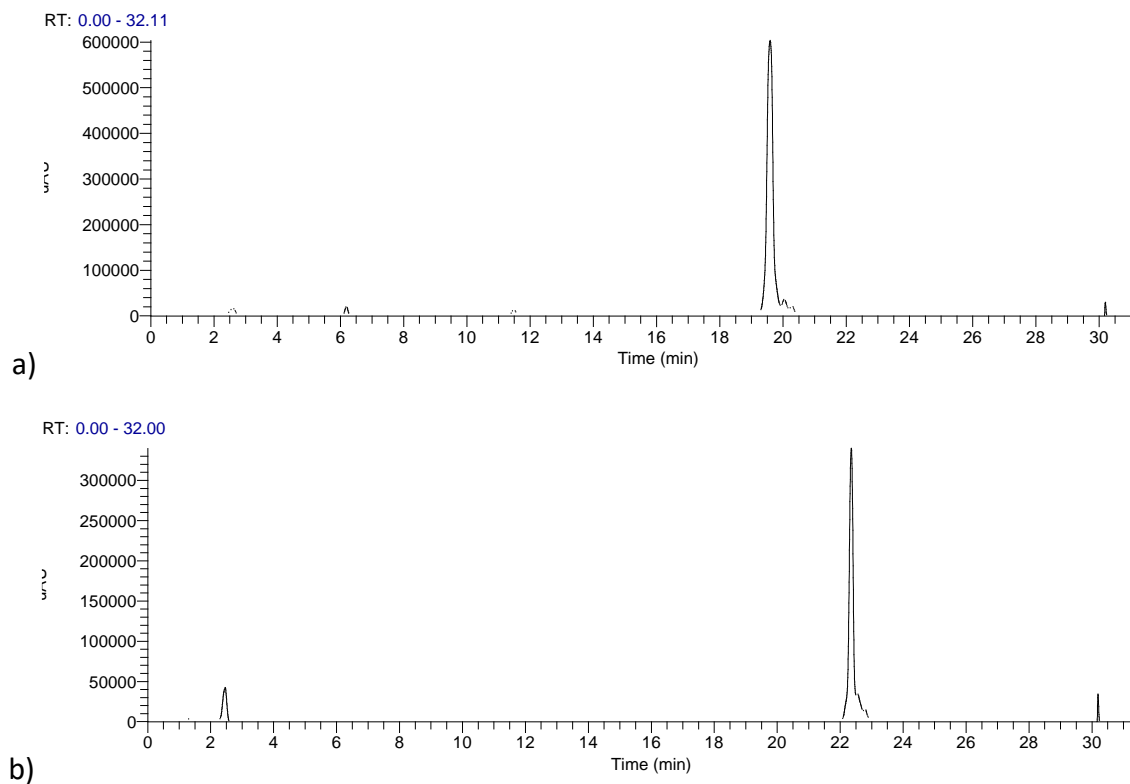


Figura 16. Cromatogramas obtenidos para a) fracción 6, guineensina; y b) fracción 9, (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida.

La guineensina aislada en la fracción 6, fue identificada según los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C que se muestran a continuación en la Figura 17, y cuyos datos se resumen en el Cuadro XIII.

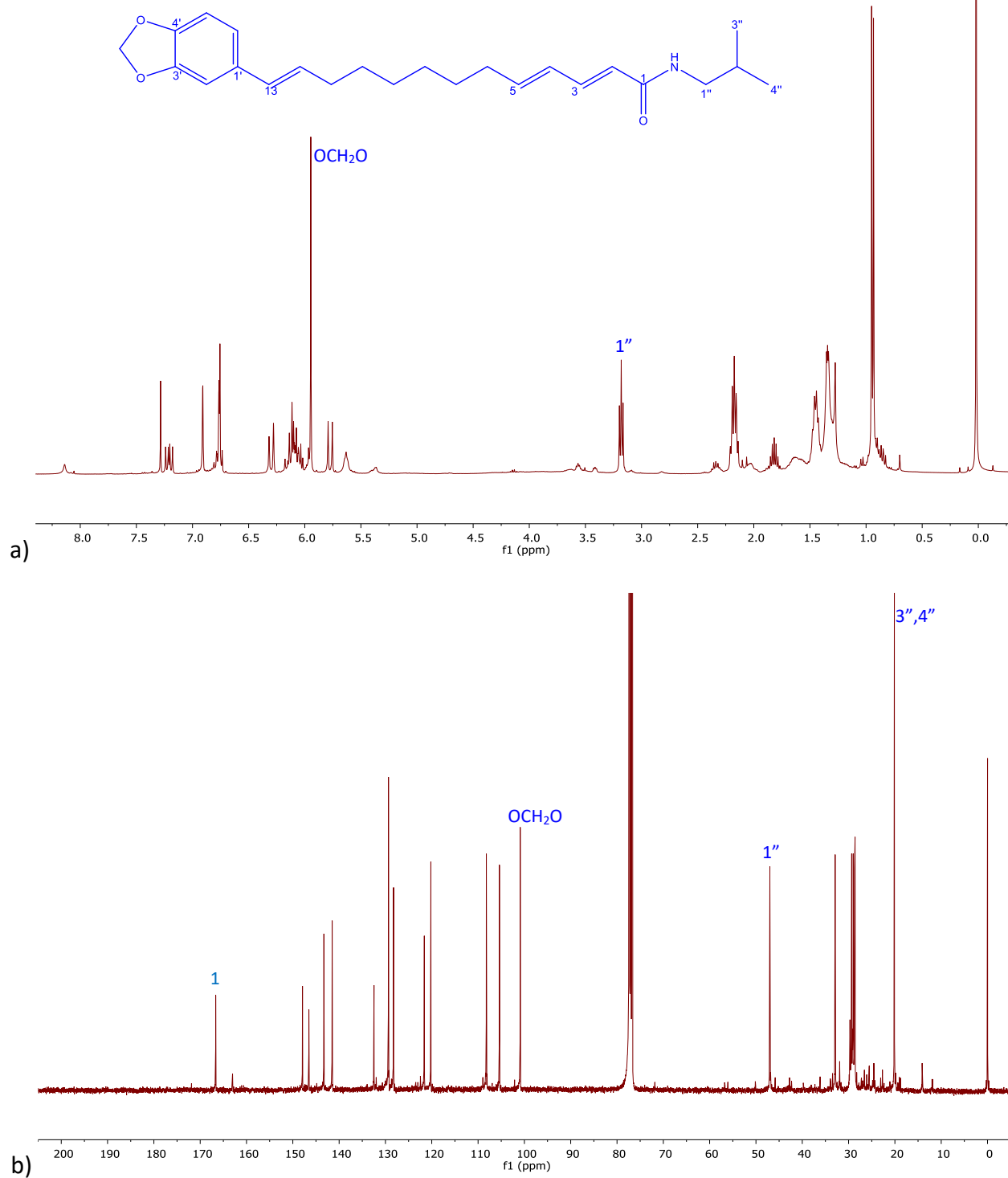


Figura 17. Espectros de guineensina aislada en la fracción 6. a) ^1H -RMN, 400 MHz, b) ^{13}C -RMN, 100 MHz. Solvente: CDCl_3 .

Cuadro XIII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros ^1H y ^{13}C -RMN de la guineensina aislada, en CDCl_3 .

#C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	166.7	
2	121.6	5.77 (d, J=15.0 Hz)
3	141.5	7.18 (dd, J=15.0, 9.8 Hz)
4,5	129.4	5.99-6.15 (m)
6	32.9	2.17 (m)
7	29.0	1.45 (m)
8	28.7	1.32 (m)
9	28.9	1.32 (m)
10	29.3	1.45 (m)
11	32.8	2.17 (m)
12	143.3	5.99-6.15 (m)
13	128.3	6.30 (d, J=15.8 Hz)
1'	132.5	
2'	105.4	6.71-6.78 (m)
3'	147.9	
4'	146.5	
5'	108.2	6.71-6.78 (m)
6'	120.2	6.91 (d, J=1.4 Hz)
-OCH ₂ O-	100.9	5.95 (s)
1''	47.0	3.16 (t, J=6.5 Hz)
2''	28.6	1.82 (m)
3'',4''	20.1	0.92 (d, J=6.7 Hz)

De forma similar, la identificación de (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida en la fracción 9 se realizó con base en los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figura 18, Cuadro XIV).

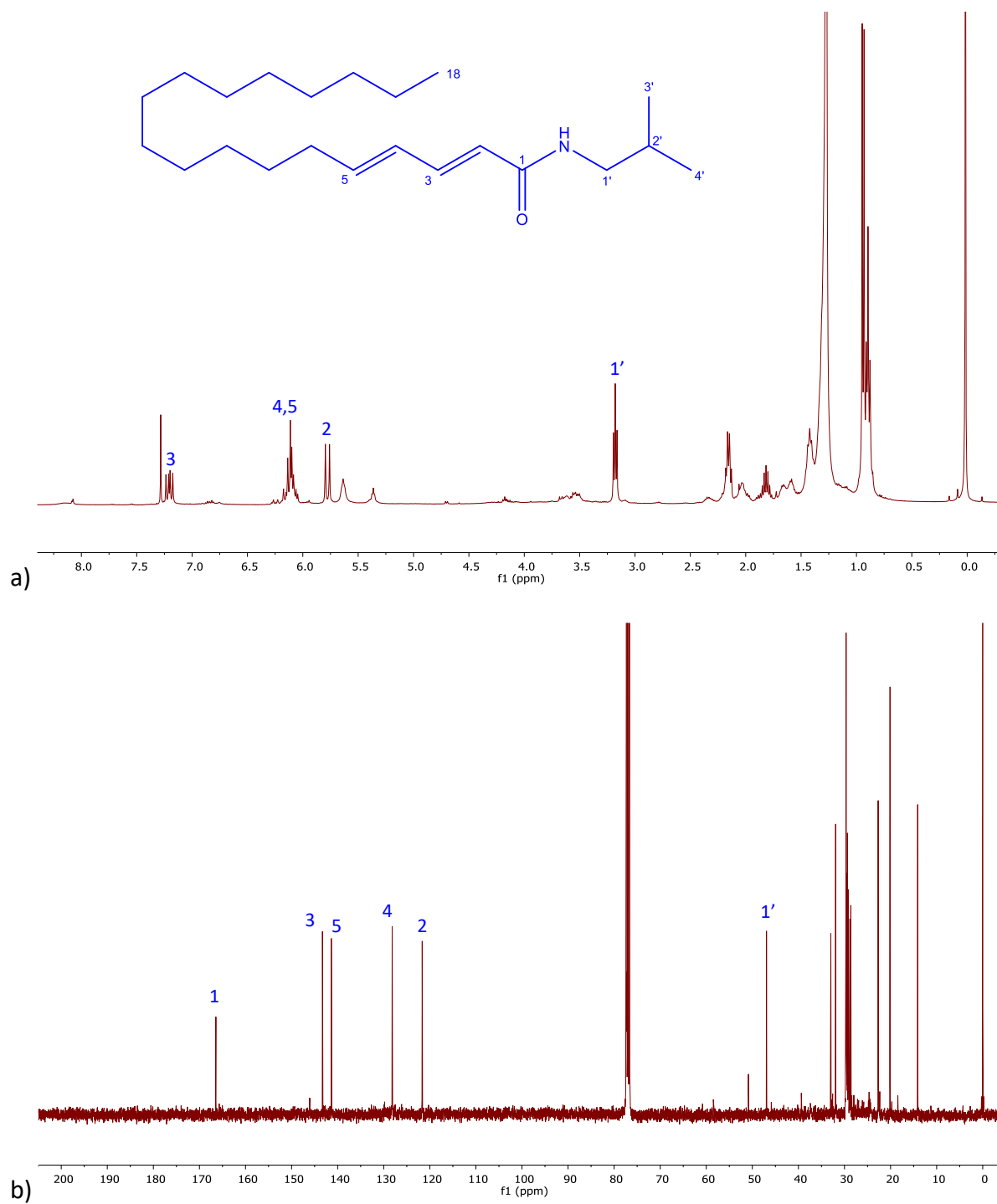


Figura 18. Espectros en CDCl_3 . a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida, aislada en la fracción 9.

Cuadro XIV. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-octadecadienamida, en CDCl_3 .

# C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	166.4	
2	121.7	5.78 (d, J=15.0 Hz)
3	143.3	7.21 (dd, J=15.0, 9.7 Hz)
4	128.2	6.12 (m)
5	141.4	6.12 (m)
6	33.0	2.16 (m)
7	29.7	1.42 (m)
8-15	28.8 - 29.7 (8 señales)	1.27 (m)
16	31.9	
17	22.7	1.27 (m)
18	14.1	0.90 (t, J=6.7 Hz)
1'	46.9	3.18 (t, J=6.5 Hz)
2'	28.6	1.82 (m)
3',4'	20.1	0.94 (d, J=6.7 Hz)

Además, en la fracción 8 fue posible identificar el compuesto (2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida como mayoritario (Figura 19).

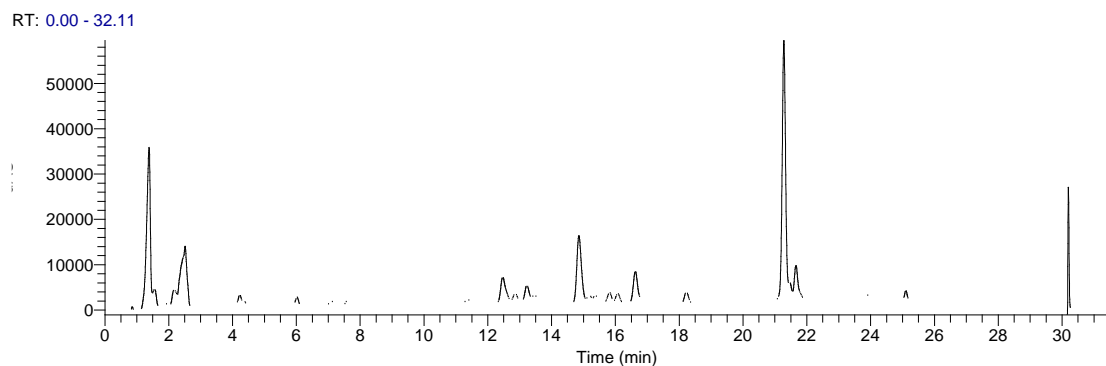


Figura 19. Cromatograma obtenido para la fracción 8, (2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figura 20, Cuadro XV) permiten la identificación del compuesto mayoritario en la fracción 9 como (2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida.

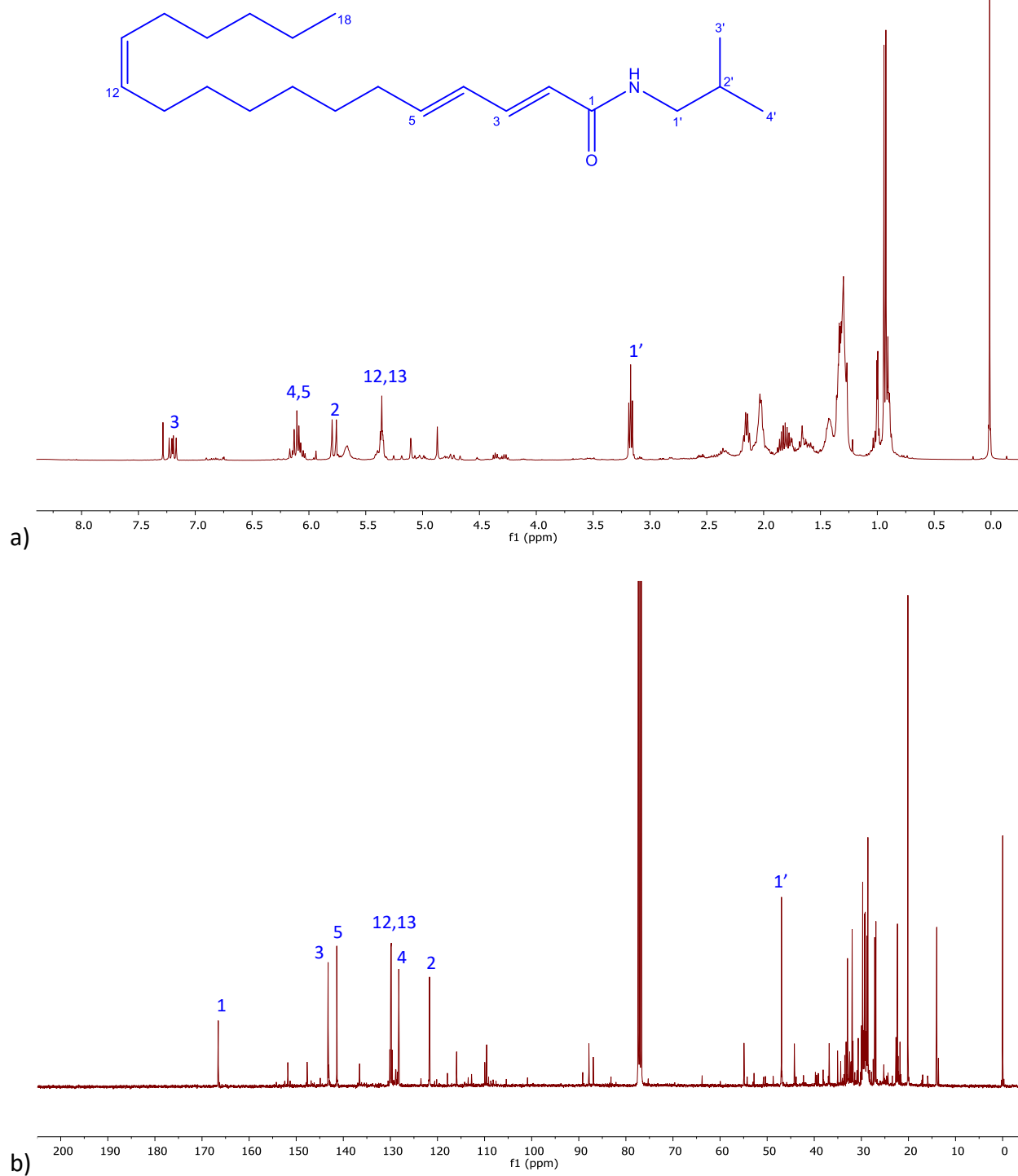


Figura 20. Espectros a) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz), y b) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) de la fracción 8 en CDCl_3 , con el compuesto mayoritario (2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida.

Cuadro XV. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto (2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida en CDCl_3 .

#C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	166.6	
2	121.7	5.78 (d, J=15.0 Hz)
3	143.2	7.20 (dd, J=15.0, 9.9 Hz)
4	128.2	6.11 (m)
5	141.4	6.11 (m)
6	32.9	2.16 (m)
7	28.8	1.43 (m)
8-10,15	29.1 - 29.7 (4 señales)	1.26-1.36 (m)
11	26.9	2.03 (m)
12	129.8	5.36 (m)
13	129.9	5.36 (m)
14	27.2	2.03 (m)
16	31.9	1.26-1.36 (m)
17	22.3	1.26-1.36 (m)
18	14.0	0.91 (m)
1'	47.0	3.17 (t, J=6.5 Hz)
2'	28.6	1.81 (m)
3',4'	20.1	0.93 (d, J=6.7 Hz)

3.7 Fraccionamiento del extracto de *C. annuum*

De la separación del extracto de *C. annuum*, según se menciona en la sección 2.2.6.1, se obtienen 8 fracciones con las masas mostradas en el Cuadro XVI.

Cuadro XVI. Rendimiento de las fracciones de *C. annuum* obtenidas por cromatografía semipreparativa.

Fracción	Masa (mg)
1	21.9
2	9.0
3	26.1
4	18.6
5	16.1
6	3.0
7	9.5
8	337.8

De estas fracciones, la fracción 3 contiene la capsaicina como compuesto mayoritario, mientras que en las fracciones 5 y 6 se recupera dihidrocapsaicina y homocapsaicina, respectivamente, con una alta pureza (Figura 21).

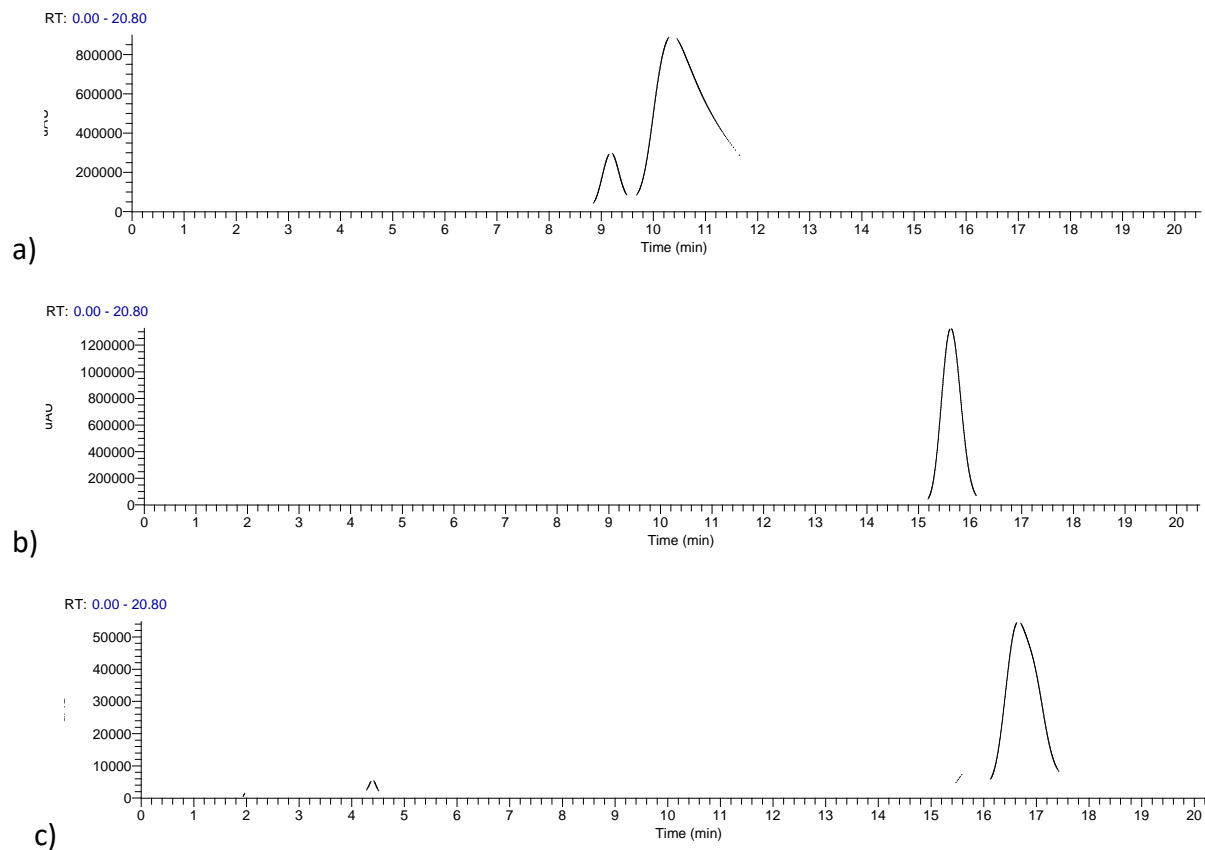


Figura 21. Cromatogramas individuales de las fracciones de *C. annuum*. a) Fracción 3, mayoritariamente capsaicina; b) fracción 5, dihidrocapsaicina; y c) fracción 6, homocapsaicina.

La identificación de la capsaicina en la fracción 3 se logró a partir de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, mostrados en la Figura 22 y Cuadro XVII.

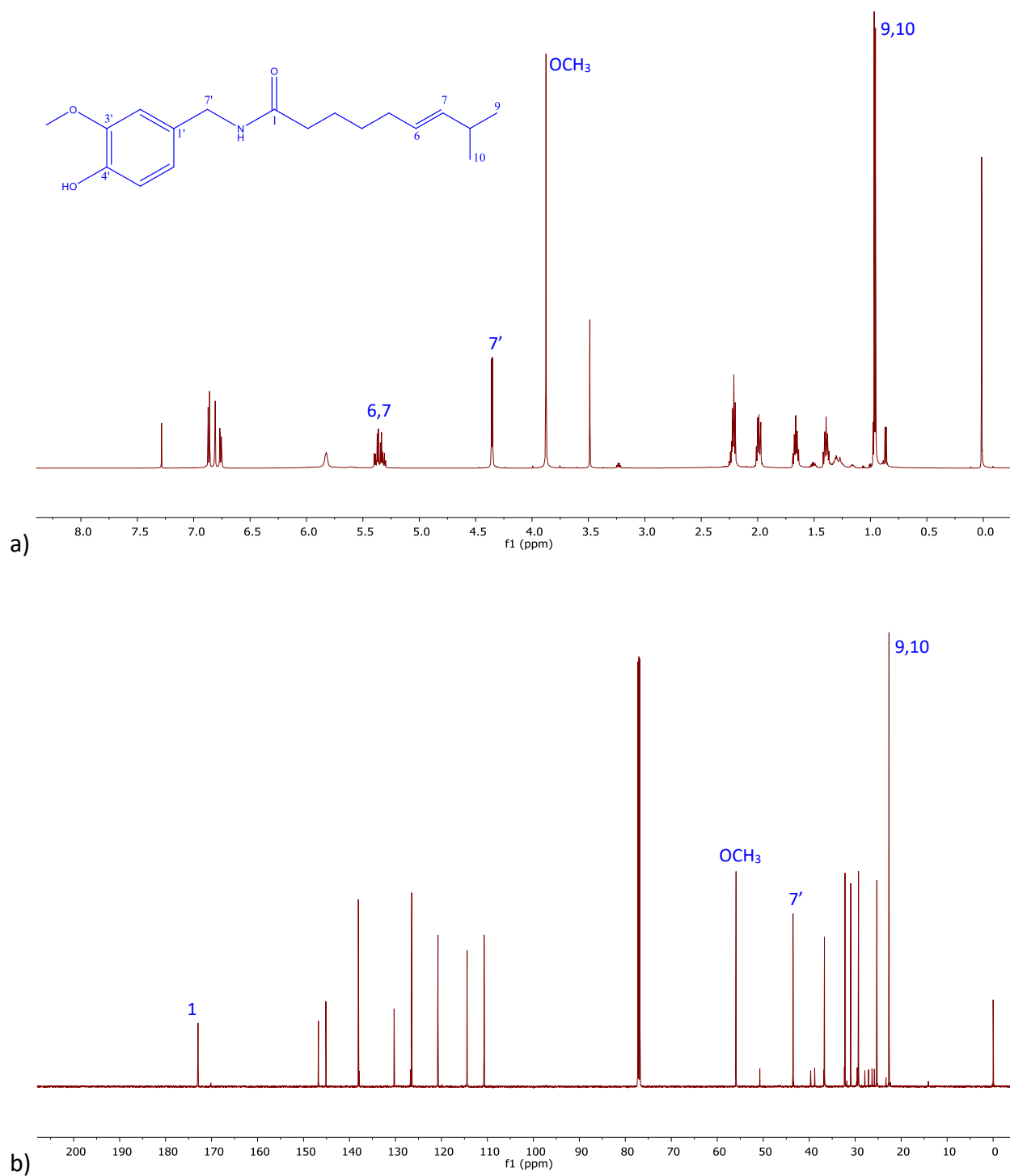


Figura 22. Espectros a) ¹H-RMN (400 MHz), y b) ¹³C-RMN (100 MHz) de la fracción 3 en CDCl₃, con capsaicina como compuesto mayoritario.

Cuadro XVII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de la capsaicina en CDCl_3 .

#C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	172.9	
2	36.7	2.22 (m, 3H)
3	25.3	1.66 (m, 2H)
4	29.3	1.39 (m, 2H)
5	32.2	1.99 (m, 2H)
6	126.5	5.35 (m, 2H)
7	138.1	5.35 (m, 2H)
8	31.0	2.22 (m, 3H)
9,10	22.6	0.95 (d, $J=6.7$ Hz, 6H)
1'	130.3	
2'	110.7	6.81 (d, $J=1.9$ Hz, 1H)
3'	146.8	
4'	145.1	
5'	114.4	6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)
6'	120.8	6.76 (dd, $J=8.0, 1.9$ Hz, 1H)
7'	43.5	4.35 (d, $J=5.6$ Hz, 2H)
-OCH ₃	55.9	3.88 (s, 3H)
NH		5.83 (s, 1H)

De forma semejante, en la fracción 5 se identificó dihidrocapsaicina con base en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figura 23 y Cuadro XVIII).

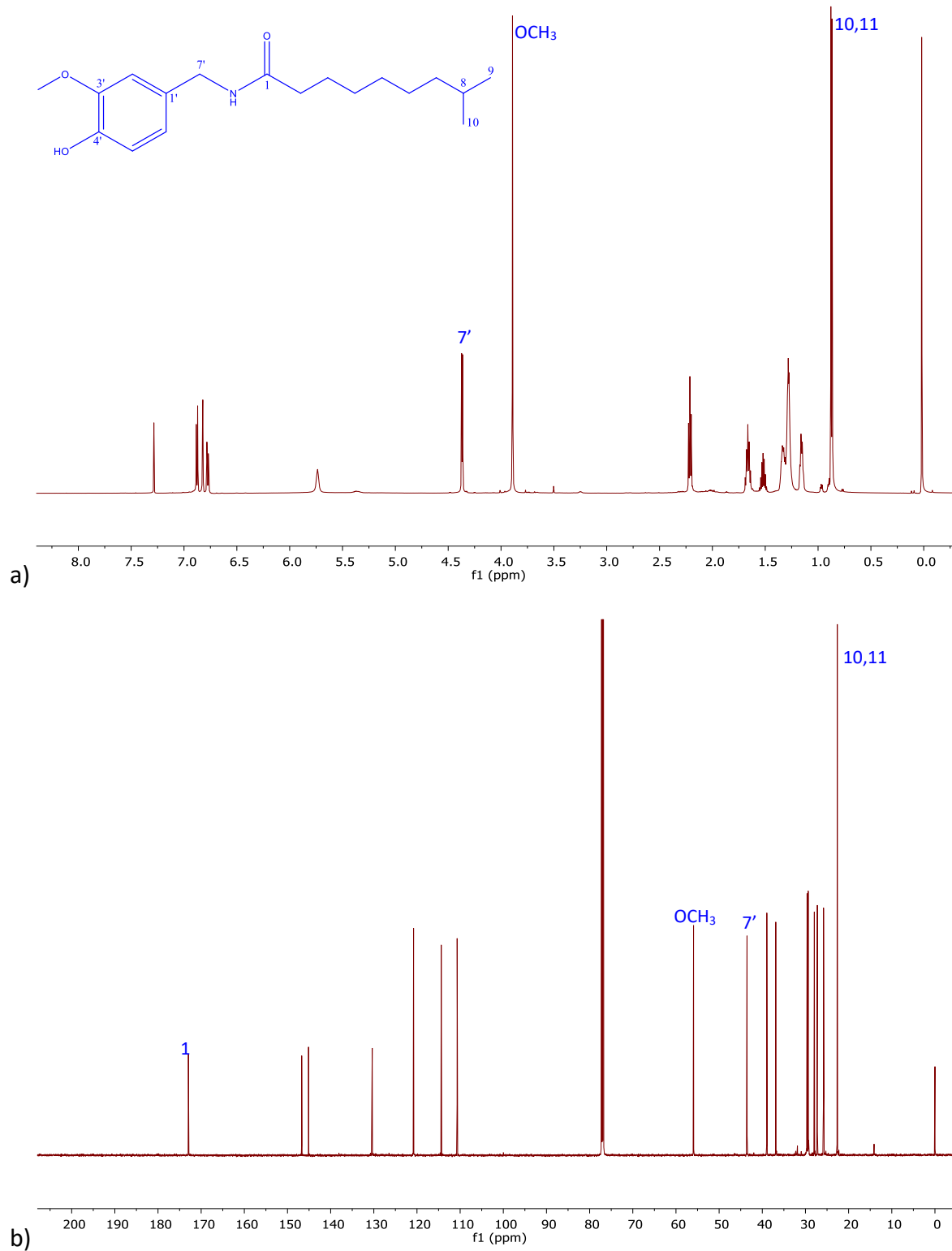


Figura 23. Espectros a) ¹H-RMN (400 MHz), y b) ¹³C-RMN (100 MHz) en CDCl₃ de la fracción 5, correspondiente a dihidrocapsaicina.

Cuadro XVIII. Desplazamientos y asignación de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de la dihidrocapsaicina en CDCl_3 .

#C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	173.0	
2	36.9	2.21 (m, $J=7.6$ Hz, 2H)
3	25.8	1.66 (m, 2H)
4	29.4	1.25-1.36 (m, 6H)
5	29.6	1.25-1.36 (m, 6H)
6	27.2	1.25-1.36 (m, 6H)
7	39.0	1.16 (m, 2H)
8	27.9	1.52 (m, 1H)
9,10	22.6	0.87 (d, $J=6.6$ Hz, 6H)
1'	130.3	
2'	110.7	6.82 (d, $J=1.9$ Hz, 1H)
3'	146.7	
4'	145.1	
5'	114.4	6.88 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)
6'	120.8	6.78 (dd, $J=8.1, 1.9$ Hz, 1H)
7'	43.5	4.37 (d, $J=5.6$ Hz, 2H)
-OCH ₃	55.9	3.89 (s, 3H)
NH		5.74 (s, 1H)

Para el caso de la fracción 6, los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figura 24, Cuadro XIX) permitieron identificar homocapsaicina como el compuesto principal.

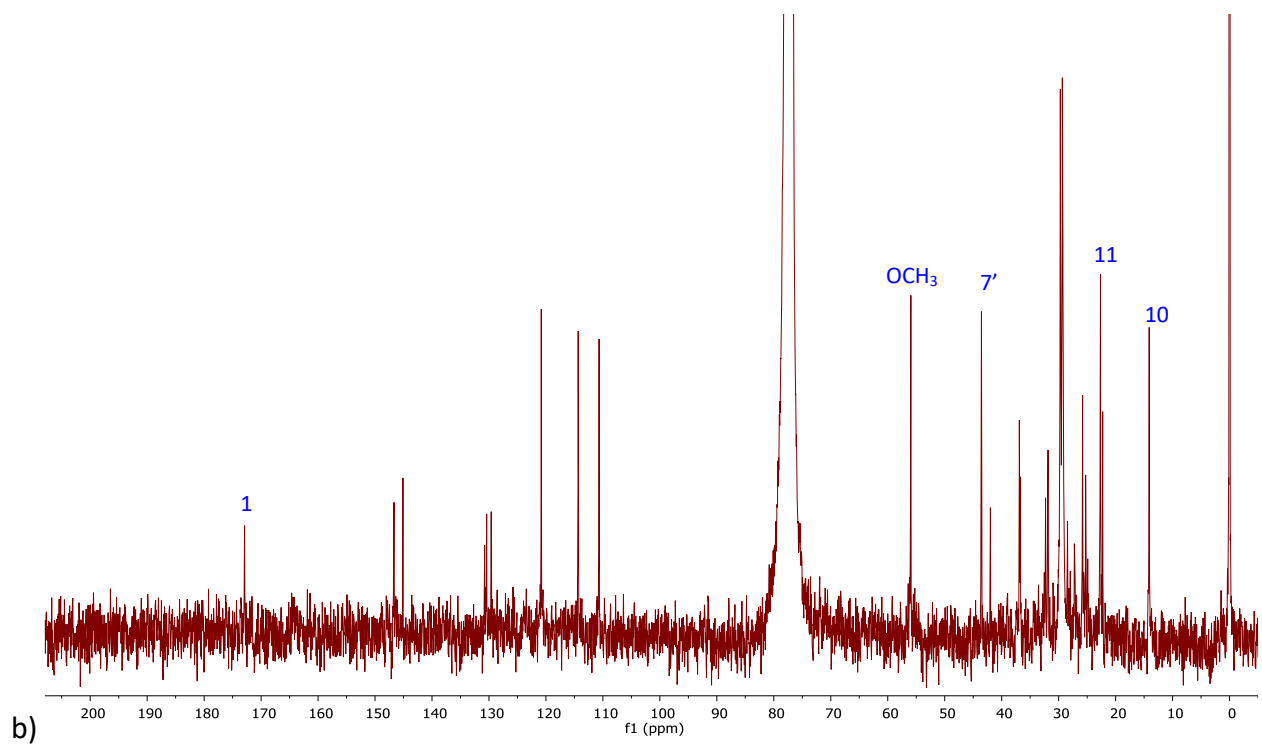
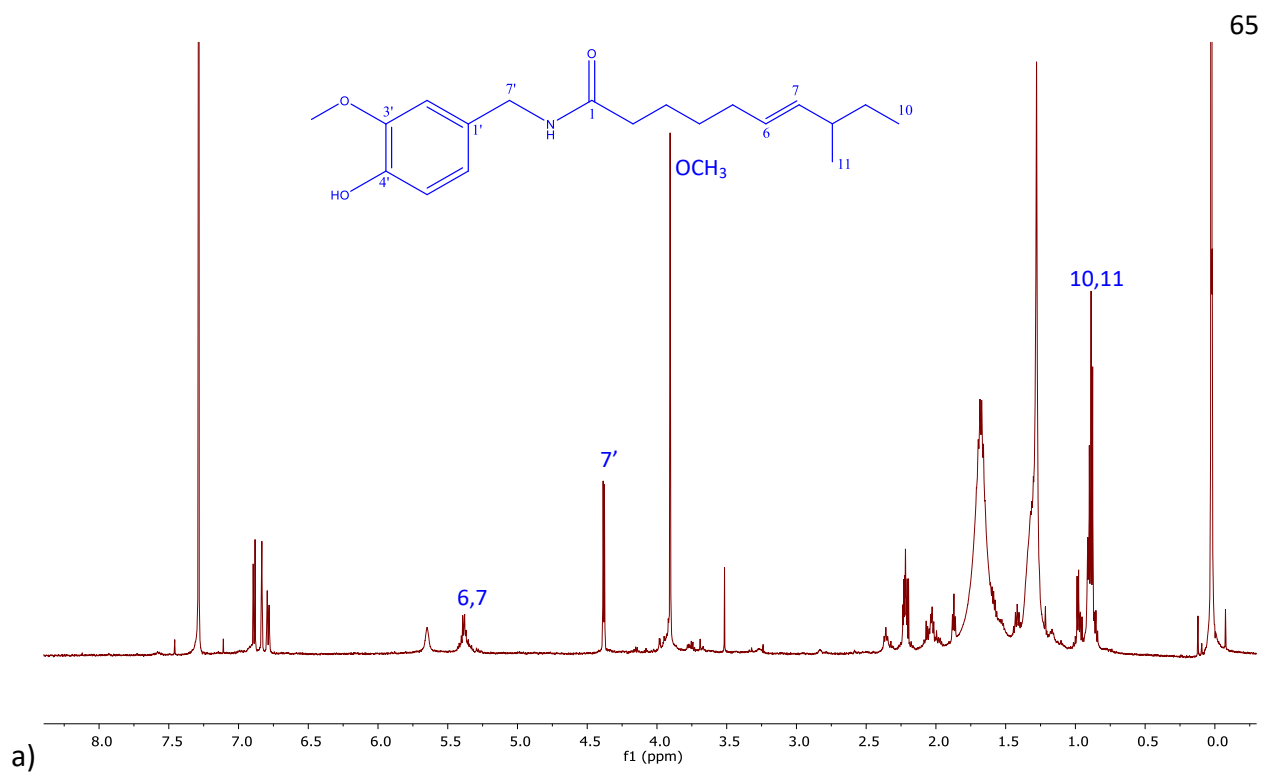


Figura 24. Espectros a) ^1H -RMN (400 MHz), y b) ^{13}C -RMN (100 MHz) de la fracción 6 en CDCl_3 , homocapsaicina.

Cuadro XIX. Desplazamientos de las señales de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en CDCl_3 de la homocapsaicina.

#C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	172.9	
2	36.7	2.22 (m, 2H)
3	25.8	1.68 (m, 3H)
4	29.3	1.24-1.37 (m)
5	32.0	2.04 (m, 1H)
6	129.6	5.36 (m, 2H)
7	130.8	5.36 (m, 2H)
8	36.9	1.68 (m, 3H)
9	29.7	1.24-1.37 (m)
10	14.1	0.89 (m, 6H)
11	22.7	0.89 (s, 6H)
1'	130.4	
2'	110.7	6.83 (d, $J=2.0$ Hz, 1H)
3'	146.7	
4'	145.1	
5'	114.3	6.89 (d, $J=1.9$ Hz, 1H)
6'	120.8	6.79 (dd, $J=7.8, 1.9$ Hz, 1H)
7'	43.6	4.38 (d, $J=5.7$ Hz, 2H)
-OCH ₃	55.9	3.90 (s, 3H)
NH		5.65 (s, 1H)

3.8 Extracción de polifenoles

Como se ha descrito en la sección 2.2.7 de la metodología, se realizaron procedimientos de extracción de polifenoles presentes en el chile, con base en la literatura (Oboh & Rocha, 2007), determinándose la eficiencia a través del análisis Folin-Ciocalteu como se describe en la sección 2.2.9. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro XX.

Cuadro XX. Determinación de Folin-Ciocalteu en muestras de chile con Extracción C-1.

Muestra	Masa inicial (g)	AG (ppm)	% Polifenoles	mg AG/100 g muestra seca	Desviación estándar
Cahfo-Extr-C-1	5.00	86.17	0.112	111.7	3.9
Cahpn-Extr-C-1	5.00	107.50	0.131	130.8	5.4
Cahva-Extr-C-1	3.18	74.50	0.092	92.2	2.2

Con base en otras referencias (Alvarez-Parrilla et al., 2011; Castro-Concha et al., 2014), se realizan otras extracciones con la muestra Cahpn, utilizando un método con extracción líquida presurizada (PLE), cuyos resultados se resumen en el Cuadro XXI.

Cuadro XXI. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extracciones C-2 y C-3.

Extracción	Solvente	Masa inicial (g)	AGE (ppm)	% Polifenoles	mg AGE/100 g muestra seca
Extr-C-2	MeOH:agua 8:2	2.002	479.09	0.060	59.82
			492.31	0.061	61.47
			488.88	0.061	61.04
Extr-C-3	MeOH	2.0012	274.49	0.069	68.58
			268.32	0.067	67.04
			270.91	0.068	67.69

De estos resultados se infiere que el mejor método de extracción con PLE utiliza metanol como disolvente (67.77 ± 0.77 mg AGE/100 g muestra seca) en comparación con la mezcla metanol: agua 8:2 (60.78 ± 0.86 mg AGE/100 g muestra seca).

Por ello, se realiza una nueva extracción utilizando metanol y repitiendo las condiciones del método PLE a excepción de la temperatura, que se aumenta a 80 °C (Shan et al., 2005). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XXII.

Cuadro XXII. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extr-C-4.

Solvente y temperatura	Masa inicial (g)	AGE (ppm)	% Polifenoles	mg AGE/100 g muestra seca
MeOH a 80°C	2.0026	178.94	0.045	44.68
		169.44	0.042	42.31
		179.04	0.045	44.70

El resultado para la extracción con metanol a 80 °C, que muestra un valor de 43.89 ± 1.38 mg AGE/100 g muestra seca, corresponde a un 65% del valor obtenido para la misma extracción

a 40 °C, por lo que se mantiene esta última temperatura para las extracciones posteriores al haberse obtenido el mejor rendimiento para la extracción Extr-C-3 de polifenoles.

Finalmente, con base en otra referencia de la literatura (Jeong et al., 2011), se decidió realizar una modificación a este proceso de extracción, repitiendo las condiciones de la Extr-C-3, pero seguidas de una extracción con disolvente orgánico, con el fin de obtener un extracto enriquecido en polifenoles. Los resultados obtenidos con la extracción Extr-C-5 se resumen en el Cuadro XXIII.

Cuadro XXIII. Determinación polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Cahpn con Extr-C-5.

Medición	Masa inicial (g)	Masa extracto (g)	% Rendimiento	mg AGE/g extracto	mg AGE/100 g muestra seca
1	1.7653	0.4146	23.49	18.69	439.0
2				18.99	445.9
3				18.40	432.2

El promedio de polifenoles totales obtenidos para la muestra Cahpn es de 439.0 ± 6.9 mg AGE/100 g muestra seca, donde se comprueba que efectivamente es un resultado muy superior a los obtenidos previamente y confirma así la obtención de un extracto enriquecido en polifenoles.

En cuanto a los polifenoles de pimienta, con base en la literatura (Bandyopadhyay et al., 1990; Chatterjee et al., 2007) se realizó un primer procedimiento de extracción utilizando MOH: agua 8:2 y ultrasonido (Extr-P-1), según lo descrito en la sección 2.2.7, el que se evalúa con el método de Folin-Ciocalteu (2.2.9), resumiéndose los resultados en el Cuadro XXIV.

Cuadro XXIV. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en las muestras de pimienta con el método Extr-P-1.

Muestra	Masa inicial (g)	AGE (ppm)	% polifenoles	mg AGE/100 g muestra seca	Desviación estándar
Pnidi	10.007	99.8	0.036	35.9	1.7
Pnien	9.9476	43.8	0.026	26.5	1.2
Pnife	10.0906	99.6	0.019	19.1	0.4

Dados los resultados obtenidos, se realizan otras extracciones con la muestra Pnien con base en otras referencias de la literatura (L. Su et al., 2007a), con los solventes, condiciones y los resultados que se resumen en el Cuadro XXV, utilizando el método de extracción líquida presurizada (PLE por sus siglas en inglés) a 40 °C, según se describe en la sección 2.2.7 de la metodología.

Cuadro XXV. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en la muestra Pnien, con los métodos Extr-P-2 a Extr-P-5.

Extracción	Condiciones	Masa inicial (g)	AGE (ppm)	% Polifenoles	mg AGE/100 g muestra seca	Desviación estándar
Extr-P-2	MeOH:agua 8:2, 2 x 15 min	1.9998	275.44	0.344	344.3	34
Extr-P-3	MeOH:agua 8:2, 5 x 6 min	2.0000	315.03	0.394	393.8	10
Extr-P-4	Acetona:agua 1:1, 2 x 15 min	2.0001	358.35	0.448	447.9	15
Extr-P-5	Acetona:agua 1:1, 5 x 6 min	2.0000	391.56	0.489	489.4	35

Se pudo observar que, con ambos disolventes, el mayor número de ciclos de extracción y menor tiempo estático permite obtener mejores resultados; mientras que la comparación entre los disolventes utilizados, en ambas condiciones de ciclos y tiempo estático de extracción, se obtienen mejores resultados con la utilización de acetona: agua como solvente, obteniéndose valores 24% y 30% mayores que con metanol: agua.

Por último, utilizando estas mejores condiciones en cuanto a disolvente, ciclos y tiempo estático de extracción en PLE, con base en la literatura (Giraldo Aricapa, 2012), se decidió aplicar este procedimiento de extracción, pero aumentando la temperatura a 70°C, realizando además una extracción previa con hexano y, luego de secado del extracto obtenido por PLE en rotavapor, realizar una extracción en agua con éter etílico. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro XXVI.

Cuadro XXVI. Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en Pnien con el método Extr-P-6.

Medición	Masa inicial (g)	Masa extracto (g)	% Rendimiento	mg AGE/g extracto	mg AGE/100 g muestra seca
1	10.4132	0.5518	5.299	109.39	579.7
2				106.23	562.9
3				109.39	579.7

El promedio de polifenoles totales obtenidos para la muestra Pnien es de 574.1 ± 9.7 mg AGE/100 g muestra seca, donde se comprueba que efectivamente es un resultado superior a los obtenidos previamente, confirmándose así la obtención de un extracto enriquecido en polifenoles.

3.9 Caracterización de polifenoles por UPLC-HRMS

El análisis de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos para los extractos de Chile según el proceso de UPLC-ESI-MS en un equipo LTQ Orbitrap XL, descrito en la sección 2.2.8, permitió la identificación de 14 polifenoles, cuyo cromatograma se muestra en la Figura 25 y la información se resume en el Cuadro XXVII.

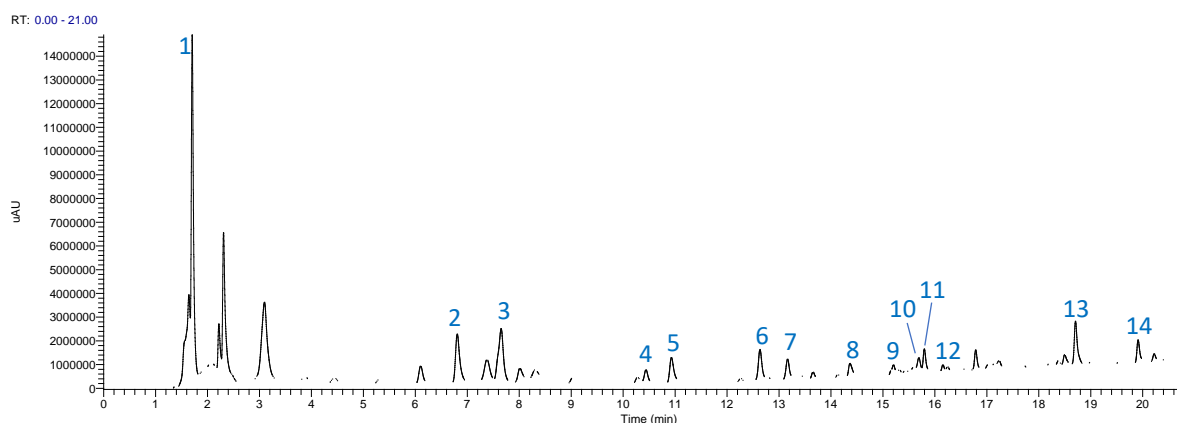


Figura 25. Cromatograma UPLC-ESI-MS (Orbitrap XL), para el extracto polifenólico de Chile.

Cuadro XXVII. Identificación por UPLC-ESI-MS usando un Orbitrap XL, de polifenoles presentes en chiles costarricenses. La presencia de cada compuesto en las muestras se representa con una equis (x).

Pico #	Identificación	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fórmula molecular	Error (ppm)	MS ²	MS ³	Cahfo	Cahpn	Cahva
1	Ácido quínico	1.70	191.0562	C ₇ H ₁₁ O ₆	3.33	[191]: 173(76), 171(32), 127(100), 109(26), 93(61), 85(89)				x
2	Ácido sinápico	6.81	223.0249	C ₁₀ H ₇ O ₆	2.86	[223]: 193(100)	[193]: 175(41), 165(100), 149(35), 137(97)			x
3	Vanilloil O-hexosa	7.65	329.0879	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	1.95	[329]: 269(29), 239(13), 209(94), 181(14), 167(100)	[167]: 152(27), 123(100)	x	x	x
4	Cumaroil O-hexosa	10.44	325.0929	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	1.71	[325]: 163(100)	[163]: 119(100)			x

5	Ácido cafeoilquínico	10.93	353.0877	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	1.25	[353]: 191	[191]: 173(88), 171(41), 127(100), 109(29), 93(59), 85(85)			x
6	Feruloil <i>O</i> -hexosa	12.63	355.1034	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	1.39	[355]: 193(11), 175(100)	[175]: 160(100)	x	x	x
7	Feruloil <i>O</i> -hexosa (isómero)	13.16	355.1034	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	1.39	[355]: 193(11), 175(100)	[175]:160(100)	x	x	x
8	Apigenina di-C-hexósido	14.37	593.1501	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-0.92	[593]: 575(12), 503(32), 473(100), 383(16), 353(29)		x	x	x
9	Apigenina C-hexosil-C-pentósido (isómero)	15.21	563.1406	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	0.92	[563]: 503(76), 473(100), 443(63), 383, 353(32)			x	x

10	Luteolina C-hexósido	15.69	447.0937	$C_{21}H_{19}O_{11}$	2.16	[447]: 429(12), 357(80), 327(100)		x	x	x
11	Isorhamnetina O-rutinósido	15.79	623.1615	$C_{28}H_{31}O_{16}$	0.47	[623]: 315(100)	[315]: 300(100)			x
12	Apigenina C-hexosil-C-pentósido (isómero)	16.16	563.1406	$C_{26}H_{27}O_{14}$	0.92	[563]: 473(59), 443(100), 383, 353(20)			x	x
13	3-O-metilorobol-hexosil- -pentosil-hexósido	18.71	755.2042	$C_{33}H_{39}O_{20}$	0.97	[755]: 593(44), 575(20), 299(100), 284(29)		x	x	x
14	3-O-metilorobol-hexosil-pentosil-acetilhexósido	19.91	797.2149	$C_{35}H_{41}O_{21}$	1.09	[797]: 755(19), 737(100), 635(13), 299(24), 284(5)				x

Por otra parte, el análisis de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos para los extractos de pimienta según el proceso de UPLC-ESI-MS en un equipo LTQ Orbitrap XL (2.2.8), permitió la identificación de 14 polifenoles (Figura 26), cuya información se resume en el Cuadro XXVIII.

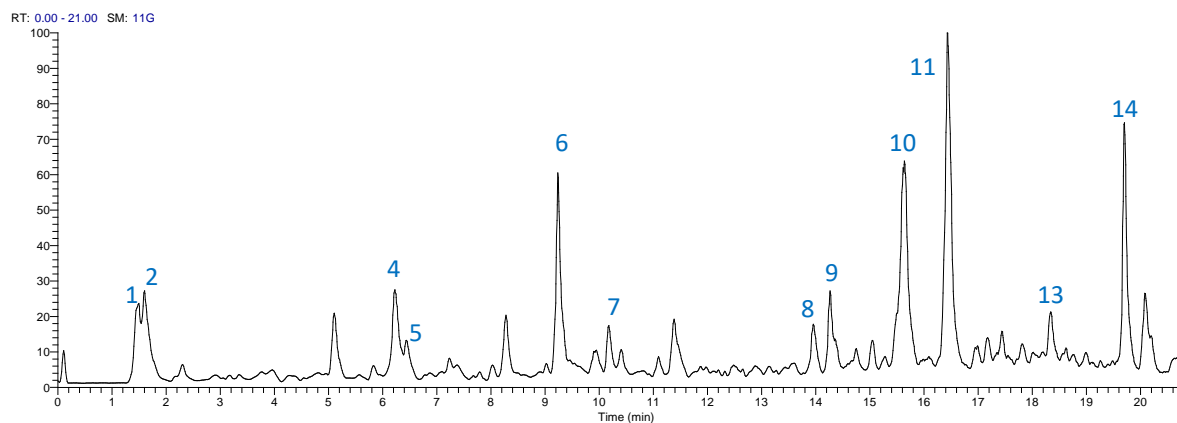


Figura 26. Cromatograma UPLC-ESI-MS medido en un Orbitrap XL, para el extracto polifenólico de pimienta.

Cuadro XXVIII. Identificación por UPLC-ESI-MS usando un Orbitrap XL de polifenoles presentes en pimientos costarricenses. La presencia de cada compuesto en las muestras se representa con una equis (x).

Pico #	Identificación	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fórmula molecular	Error (ppm)	MS ²	MS ³	Pnidi	Pnien	Pnife
1	Sacarosa	1.63	341.1088	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	1.21	[341]: 179(100), 161(20), 143(17)		x	x	x
2	Ácido 4- <i>O</i> -metilglucónico	1.70	209.0665	C ₇ H ₁₃ O ₇	1.78	[209]: 159(52), 129(100)		x		x
3	Periplobiosa	5.13	323.134	C ₁₃ H ₂₃ O ₉	-0.64	[323]:143(94), 179(100), 161(36)		x	x	x
4	Hidroxitirosol- <i>O</i> -hexósido	6.25	315.1079	C ₁₄ H ₁₉ O ₈	-0.29	[315]:135(100)	[135]: 107(100)	x	x	x
5	Hidroxitirosol-di- <i>O</i> -hexósido	6.5	477.1615	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₃	1.43	[477]: 315(100)	[315]: 135(100)	x		x
6	Hidroxitirosol- <i>O</i> -pentosil- <i>O</i> -hexósido	8.28	447.1501	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₂	-0.34	[447]:315 (100)	[315]: 135(100)	x	x	x
7	Hidroxitirosol- <i>O</i> -ramnosil- <i>O</i> -hexósido	9.26	461.1657	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	-0.44	[461]: 315(100), 135(41)		x	x	x

8	Ácido dihidrofaseico- <i>O</i> -hexósido	10.19	443.1924	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀	1.53	[443]: 281(96), 237(100), 219(93), 189(46), 161(90), 143(59)		x	x	x
9	Ácido siríngico	13.97	197.0455	C ₉ H ₉ O ₅	2.55	[197]: 182(21), 153(100)		x	x	x
10	Apigenina di- <i>C</i> - hexósido	14.28	593.1492	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-2.44	[593]: 503(33), 473(100), 353(27)		x	x	x
11	Apigenina di- <i>C</i> - hexósido (isómero)	15.65	593.1494	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-2.10	[593]: 473(100)		x	x	x
12	Apigenina <i>C</i> -(<i>O</i> - ramnosil)-hexósido	16.45	577.1545	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	-2.13	[577]: 413(100), 293(15)	[413]: 293(100)	x	x	x
13	Luteolina <i>O</i> - desoxihexosil- <i>O</i> - pentosa	18.36	563.1388	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	-2.27	[563]: 417(22), 285(100)	[285]: 241(48), 217(47), 199(50), 175(46)	x	x	x
14	Apigenina <i>O</i> -apiosil- <i>O</i> - desoxihexósido	19.72	547.1442	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₃	-1.77	[547]: 269(100)		x	x	x

3.10 Determinación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

La aplicación de las mejores condiciones de extracción para la extracción de polifenoles de chile, descritas en la sección 3.8, permitió obtener los rendimientos que se resumen en el Cuadro XXIX.

Cuadro XXIX . Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de polifenoles de *C. annuum* utilizando el método optimizado Extr-C-5.

Muestra	Masa muestra seca (g)	Masa extracto (g)	% rendimiento
Cahfo	7.4976	1.9256	25.683
Cahpn	1.7653	0.4146	23.486
Cahva	7.5295	2.2167	29.440

La cuantificación de los polifenoles totales por Folin-Ciocalteu en las muestras de *C. annuum* restantes se muestra en el Cuadro XXX.

Cuadro XXX. Valores individuales de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, obtenidos para los extractos polifenólicos Extr-C-5 de las muestras Cahfo y Cahva.

Muestra	Medición	Masa inicial (g)	Masa extracto (g)	% Rendimiento	mg AGE/g extracto	mg AGE/100 g muestra seca
Cahfo	1	7.4976	1.9256	25.683	19.12	491.1
	2				19.61	503.6
	3				18.54	476.0
Cahva	1	7.5295	2.2167	29.440	23.21	683.2
	2				22.22	654.3
	3				21.93	645.6

Finalmente, el Cuadro XXXI resume los resultados globales del análisis Folin-Ciocalteu para las muestras de Chile.

Cuadro XXXI. Resumen de los valores de polifenoles totales obtenidos para los extractos polifenólicos de las muestras de *C. annuum*, mediante el método Folin-Ciocalteu.

Muestra	mg AGE/g extracto	Desviación estándar	mg AGE/100 g muestra seca ¹	Desviación estándar
Cahfo	19.1	0.54	490.2 ^b	13.8
Cahpn	18.7	0.29	439.0 ^c	6.9
Cahva	22.5	0.67	662.4 ^a	19.7

¹ Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey *post-hoc* test

Los promedios obtenidos para las muestras Cahfo (490.2 ± 13.8 mg AG/100 g muestra seca) y Cahva (661.0 ± 19.7 mg AG/100 g muestra seca) demuestran que la muestra más rica en

contenido polifenólico corresponde a Cahva, con un valor un 35% superior a la muestra Cahfo, y un 51% superior a la muestra Cahpn.

Por otro lado, la aplicación de las mejores condiciones de extracción para la extracción de polifenoles de pimienta, descritas en la sección 3.8. permitió obtener los rendimientos que se resumen en el Cuadro XXXII.

Cuadro XXXII. Rendimientos porcentuales obtenidos para la extracción de polifenoles de *P. nigrum* utilizando el método optimizado Extr-P-6.

Muestra	Masa muestra seca (g)	Masa extracto (g)	% rendimiento
Pnidi	10.0054	0.2568	2.567
Pnien	10.4132	0.5518	5.299
Pnife	10.0525	0.2449	2.436

Los análisis Folin-Ciocalteu para las muestras restantes de pimienta se encuentran en el Cuadro XXXIII.

Cuadro XXXIII. Valores individuales de polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu, obtenidos para los extractos polifenólicos Extr-P-6 de las muestras Pnidi y Pnife.

Muestra	Medición	Masa inicial (g)	Masa extracto (g)	% Rendimiento	mg AGE/g extracto	mg AGE/100 g muestra seca
Pnidi	1	10.0054	0.2568	2.567	130.83	335.8
	2				128.64	330.2
	3				132.05	338.9
Pnife	1	10.0525	0.2449	2.436	97.46	237.4
	2				96.26	234.5
	3				95.30	232.2

Los resultados del contenido polifenólico en Pnidi y Pnife, muestran ambos valores inferiores a los obtenidos para la muestra Pnien (Cuadro XXVI). En el Cuadro XXXIV se encuentra un resumen con los resultados de la cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu para las muestras de *P. nigrum*.

Cuadro XXXIV. Resumen de los valores de polifenoles totales obtenidos para los extractos polifenólicos de las muestras de *P. nigrum*, mediante el método Folin-Ciocalteu.

Muestra	mg AGE/g extracto	Desviación estándar	mg AGE/100 g muestra seca ¹	Desviación estándar
Pnidi	130.5	1.7	335.0 ^b	4.4
Pnien	108.3	1.8	574.1 ^a	9.7
Pnife	96.3	1.1	234.7 ^c	2.6

¹Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey post-hoc test

3.11 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Siguiendo el procedimiento explicado en la sección 2.2.10 de la metodología, se realizaron experimentos con los extractos polifenólicos de Chile para obtener las curvas que permiten expresar los resultados como IC₅₀. Los valores obtenidos se resumen en el Cuadro XXXV.

Cuadro XXXV. Valores de actividad antioxidante para *C. annuum* obtenidos por el método DPPH.

Muestra	IC ₅₀ (µg extracto/mL)	Desviación estándar	IC ₅₀ (mg muestra seca/mL) ¹	Desviación estándar
Cahfo	415	8	1.62 ^b	0.02
Cahpn	563	40	2.40 ^a	0.11
Cahva	309	13	1.05 ^c	0.03

¹Diferentes Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey post-hoc test.

Asimismo, el Cuadro XXXVI muestra los resultados IC₅₀ del análisis antioxidante por DPPH (2.2.10) para los extractos polifenólicos de pimienta.

Cuadro XXXVI. Valores de actividad antioxidante para *P. nigrum* obtenidos por el método DPPH.

Muestra	IC ₅₀ (µg extracto/mL)	Desviación estándar	IC ₅₀ (mg muestra seca/mL) ¹	Desviación estándar
Pnidi	44.51	0.56	1.76 ^b	0.01
Pnien	65.7	1.66	1.24 ^c	0.02
Pnife	73.57	1.11	3.03 ^a	0.01

¹Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey post-hoc test.

3.12 Determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC

Siguiendo el procedimiento explicado en la sección 2.2.11 de la metodología, se realizaron experimentos con los extractos polifenólicos de chile y con Trolox como estándar, para obtener las curvas de ORAC que permiten expresar los resultados como mmol TE. Estos se resumen en el Cuadro XXXVII.

Cuadro XXXVII. Valores de actividad antioxidante para *C. annuum* obtenidos por el método ORAC.

Muestra	mmol TE/g extracto	Desviación estándar	mmol TE/100 g muestra seca ¹	Desviación estándar
Cahfo	0.56	0.01	14.35 ^b	0.23
Cahpn	0.55	0.02	12.94 ^c	0.39
Cahva	0.65	0.02	19.23 ^a	0.37

¹Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey post-hoc test.

En el caso de los extractos polifenólicos de pimienta, el Cuadro XXXVIII

Cuadro XXXVIII muestra los resultados del ensayo ORAC respecto al Trolox como estándar.

Cuadro XXXVIII. Valores de actividad antioxidante para *P. nigrum* obtenidos por el método ORAC.

Muestra	mmol TE/g extracto	Desviación estándar	mmol TE/100 g muestra seca¹	Desviación estándar
Pnidi	3.32	0.02	13.53 ^b	0.35
Pnien	3.63	0.05	20.07 ^a	0.02
Pnife	3.72	0.04	8.92 ^c	0.07

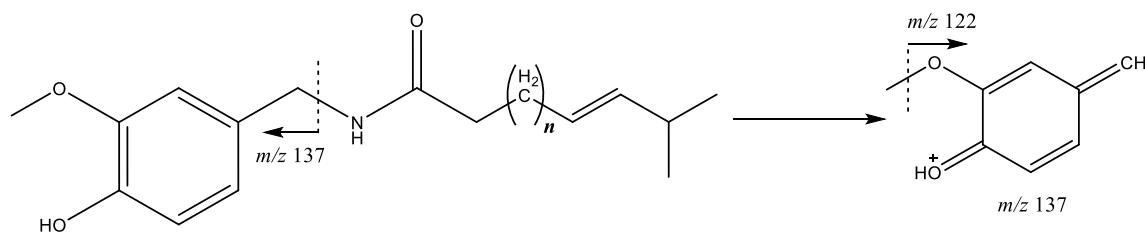
¹Diferentes letras en los superíndices, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) aplicando análisis ANOVA unidireccional seguido de un Tukey post-hoc test.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

4.1 Caracterización HRMS de amidas de *C. annuum* y *P. nigrum* costarricenses

En cuanto a la caracterización de las amidas de *C. annuum*, a través de UPLC-QTOF-ESI MS, cuyos resultados se resumen en el Cuadro IV de la sección 3.2, a continuación se presenta el análisis que conllevó a la identificación tentativa de los 12 compuestos.

Los picos 1 ($t_R = 12.82$ min), 3 ($t_R = 14.22$ min) y 5 ($t_R = 15.20$ min) muestran iones pseudo-moleculares respectivos $[M+H]^+$ a m/z 278.1759 ($C_{16}H_{24}NO_3$), m/z 292.1906 ($C_{17}H_{26}NO_3$) y m/z 306.2093 ($C_{18}H_{28}NO_3$), asignados respectivamente como nornorcapsaicina, norcapsaicina y capsaicina respectivamente. Estos compuestos presentan un fragmento característico a m/z 137 (Figura 27), el cual corresponde a un derivado del grupo vanílico (Rosas et al., 2019). La pérdida adicional de un metilo produce el fragmento a m/z 122 en el pico 4 (Schweiggert et al., 2006).

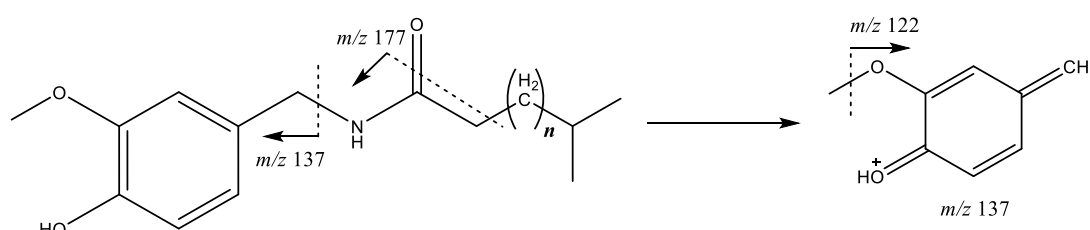


Compuesto	n
1	1
3	2
5	3

Figura 27. Estructura y patrón de fragmentación para la capsaicina, norcapsaicina y nornorcapsaicina.

La nornordihidrocapsaicina (pico 2, $t_R = 13.94$ min), nordihidrocapsaicina (pico 4, $t_R = 15.04$ min) y la dihidrocapsaicina (pico 7, $t_R = 16.25$ min) se identifican con base a sus iones $[M+H]^+$ respectivos a m/z 280.1936 ($C_{16}H_{26}NO_3$), m/z 294.2092 ($C_{17}H_{28}NO_3$) y m/z 308.2255 ($C_{18}H_{30}NO_3$)

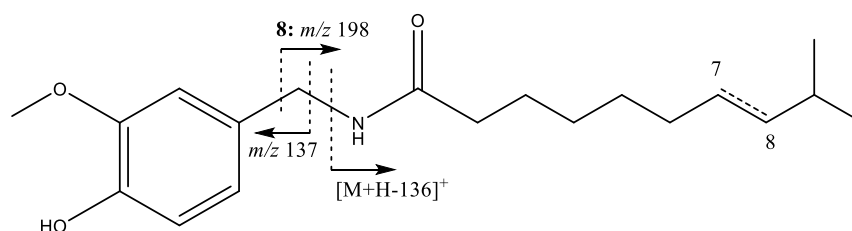
Figura 28. Los tres picos presentan los fragmentos a m/z 137 y m/z 122 explicados anteriormente, pero el pico 2 produce también un fragmento a m/z 177 generado por el rearrreglo McLafferty de la amida seguido de la pérdida de una molécula de agua (Schweiggert et al., 2006)



Compuesto	n
2	3
4	4
7	5

Figura 28. Estructura y patrón de fragmentación para la dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y nornordihidrocapsaicina.

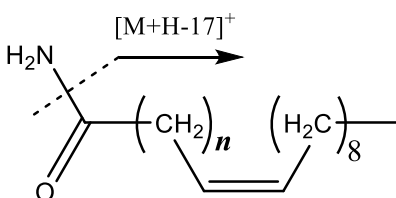
Asimismo, el pico 6 ($t_R = 16.20$ min) muestra un ion $[M+H]^+$ a m/z 320.2231 ($C_{19}H_{30}NO_3$) asignado como homocapsaicina I/II (Figura 29), con un fragmento a m/z 184 consecuencia de la pérdida del anillo vanílico (136 Da), observándose a su vez el derivado del grupo vanílico a m/z 137. El pico 8 ($t_R = 16.97$ min), con un ion $[M+H]^+$ a m/z 322.2371 ($C_{19}H_{32}NO_3$) se asignó a la homodihidrocapsaicina I/II. Además del fragmento a m/z 137, presenta fragmentos a m/z 186 $[M+H-136]^+$ y m/z 198 que se obtienen por la ruptura del enlace amida y la ruptura del enlace contiguo al grupo aromático de forma respectiva (Figura 29).



Compuesto	C7-C8
6	C=C
8	C-C

Figura 29. Estructura y fragmentos de homocapsaicina I y homodihidrocapsaicina I.

Los picos 9 ($t_R = 19.05$ min, $[M+H]^+ = 282.2805$, $(C_{18}H_{36}NO)$) y 12 ($t_R = 22.76$ min, $[M+H]^+ = 338.3461$, $(C_{22}H_{44}NO)$) se asignaron respectivamente a oleamida y 13-docosenamida (Figura 30). Ambos compuestos presentan el fragmento $[M+H-17]^+$ (m/z 265 y m/z 321 respectivamente) generado por la pérdida de NH_3 , mientras que la subsecuente pérdida de H_2O produce el fragmento $[M+H-35]^+$ (m/z 247 en el pico 9 y m/z 303 en el pico 12) (Munigunti et al., 2011).



Compuesto	n
9	7
12	11

Figura 30. Estructura y fragmentación de la oleamida y la 13-docosenamida.

El pico 10 ($t_R = 20.22$ min) tiene un ion $[M+H]^+$ a m/z 270.2822 ($C_{17}H_{36}NO$), que corresponde con la capsiamida (Figura 31) (FooDB, 2019).

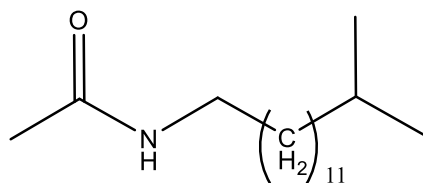


Figura 31. Estructura de la capsiamida.

Finalmente, el pico 11 ($t_R = 20.98$ min) se asigna a la octadecanamida (Figura 32) con base al ion $[M+H]^+$ a m/z 284.2957 ($C_{18}H_{38}NO$) (FoodDB, 2018).

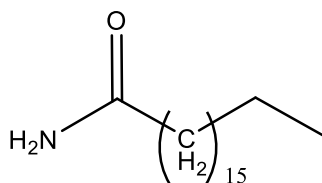


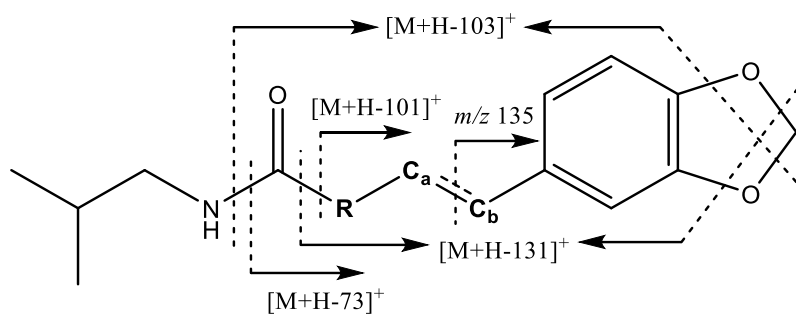
Figura 32. Estructura de la octadecanamida.

Por su parte, en cuanto a la caracterización de las amidas de *Piper nigrum* a través de UPLC-QTOF-ESI MS, cuyos resultados se muestran en el Cuadro V, la identificación de los 31 compuestos se realizó según el análisis descrito a continuación.

El pico 1 ($t_R = 11.17$ min) presenta un ion $[M+H]^+$ a m/z 274.1420 ($C_{16}H_{20}NO_3$), asignado a la piperlonguminina. Este pico posee un fragmento a m/z 201 $[M+H-73]^+$ que corresponde a la pérdida de isobutilamina, el fragmento a m/z 173 $[M+H-101]^+$ se explica por la pérdida de la amida, y el fragmento a m/z 135 se origina por la ruptura de la cadena alifática en el enlace bencílico, generando un metilbenzodioxol (Figura 33) (K. Li et al., 2015)). De forma semejante, en el pico 3 ($t_R = 13.21$ min) se identifica la dihidropiperlonguminina ($[M+H]^+ = 276.1620$, $C_{16}H_{22}NO_3$), con el fragmento a m/z 135 característico del metilendioxofenilo, pero también presenta los fragmentos a m/z 173 $[M+H-103]^+$ y m/z 145 $[M+H-131]^+$, que corresponden con las pérdidas de 73 Da y 101 Da explicadas anteriormente, y con una pérdida adicional de CH_2O (30 Da) por el rompimiento del grupo metilendioxo en el anillo aromático (Chithra et al., 2014).

Otros picos que experimentan estos patrones de fragmentación (Figura 33) son el 9 ($t_R = 18.90$ min) asignado a retrofractamida A, con ion $[M+H]^+$ a m/z 328.1944 ($C_{20}H_{26}NO_3$) y fragmentos a m/z 255 $[M+H-73]^+$, m/z 227 $[M+H-101]^+$, m/z 135, y un pico adicional a m/z 161 que corresponde al rompimiento de la cadena alifática central y genera un propenildioxofenilo (K. Li et al., 2015; Zaugg et al., 2010); el pico 10 ($t_R = 20.07$ min) correspondiente a pipercallosina (K. Li et al., 2013), $[M+H]^+ = 330.2108$ ($C_{20}H_{28}NO_3$) con fragmentos característicos a m/z 229 $[M+H-101]^+$ y m/z 135; el pico 14 ($t_R = 22.86$ min), asignado como retrofractamida B, con $[M+H]^+ = 356.2261$ ($C_{22}H_{30}NO_3$) y fragmentos característicos a m/z 283 $[M+H-73]^+$, m/z 255 $[M+H-101]^+$ y m/z 135, pero además se observa el fragmento a m/z 161 (Kikuzaki et al., 1993; Scott et al., 2005); el pico 16 ($t_R = 24.13$ min), coincidente con piperchabamida D dado su $[M+H]^+ = 358.2411$ ($C_{22}H_{32}NO_3$) con fragmentos a m/z 285 $[M+H-73]^+$, m/z 227 $[M+H-131]^+$, y m/z 135 (K. Li et al., 2013).

Asimismo, el pico 20 ($t_R = 26.77$ min), con $[M+H]^+ = 384.2591$ ($C_{24}H_{34}NO_3$) correspondiente a guineensina, y fragmentos a m/z 311 $[M+H-73]^+$, m/z 283 $[M+H-101]^+$, m/z 161 y m/z 135 (Rao et al., 2011; Scott et al., 2008); el pico 21 ($t_R = 27.99$ min), $[M+H]^+ = 386.2699$ ($C_{24}H_{36}NO_3$), se identifica como piperflaviflorina A (Shi et al., 2017), con fragmentos característicos a m/z 313 $[M+H-73]^+$ y m/z 135; el pico 24 ($t_R = 30.54$ min) posee un ion $[M+H]^+ = 412.2857$ ($C_{26}H_{38}NO_3$), asignado a brachistamida B (Banerji et al., 2002), con fragmentos a m/z 339 $[M+H-73]^+$, m/z 311 $[M+H-101]^+$, m/z 161 y m/z 135; y el pico 26 ($t_R = 34.75$ min) que presenta el ion $[M+H]^+ = 426.3001$ ($C_{27}H_{40}NO_3$), asignado como brachistamida D (Banerji et al., 2002; Okwute & Egharevba, 2013) por la masa obtenida y por el fragmento a m/z 135 del metilbenzodioxol (Figura 33).



Compuesto	R	C _a -C _b
1		C=C
3		C-C
9		C=C
10		C-C
14		C=C
16		C=C
20		C=C
21		C=C
24		C=C
26		C=C

Figura 33. Estructura y principales fragmentos de compuestos con el grupo metilendioxofenilo y cadena lateral de isobutilamina.

Otra serie de compuestos sustituye la cadena alifática unida al nitrógeno por un ciclo pirrolidina (Figura 34), generando fragmentos característicos a $[M+H-71]^+$ por la pérdida de la pirrolidina, a $[M+H-99]^+$ por la pérdida de la amida, y luego las pérdidas anteriores sumadas al desprendimiento de una molécula de CH_2O (30 Da) proveniente del benzodioxol produce los iones $[M+H-101]^+$ y $[M+H-129]^+$ respectivamente.

De esta manera, se determinó que el pico 2 ($t_R = 11.33$ min) corresponde a la piperilina (Ramesh et al., 2015a; Salehi et al., 2019), con base en su ion pseudo-molecular $[M+H]^+ = 272.1327$ ($C_{16}H_{18}NO_3$) y los fragmentos observados a m/z 201 $[M+H-71]^+$, m/z 171 $[M+H-101]^+$, m/z 143 $[M+H-129]^+$ y el fragmento a m/z 135 del metilbenzodioxol. De forma semejante, el pico 7 ($t_R = 17.53$ min), $[M+H]^+ = 326.1804$ ($C_{20}H_{24}NO_3$) se asigna al compuesto (2*E*,4*E*,8*E*)-Piperamida-C9:3 (Dawid et al., 2012), con fragmentos característicos en m/z 227 $[M+H-99]^+$ y m/z 197 $[M+H-129]^+$; y el pico 19 ($t_R = 26.54$ min) se establece como brachiamida A (Dawid et al., 2012), dado el ion $[M+H]^+ = 382.2458$ ($C_{24}H_{32}NO_3$) y los fragmentos a m/z 311 $[M+H-71]^+$, m/z 283 $[M+H-99]^+$, m/z 135 (metilbenzodioxol) y m/z 161 (propenilbenzodioxol).

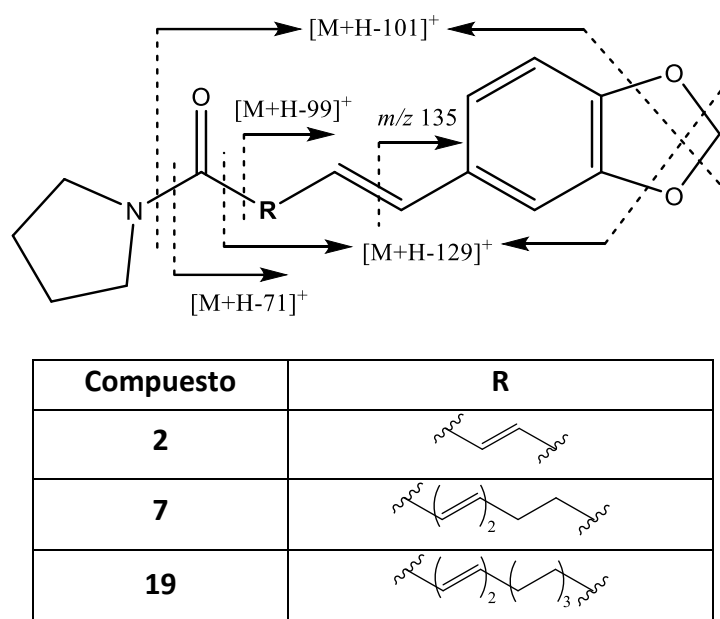


Figura 34. Estructura y fragmentación de metilendioxofenil amidas con cadena lateral de piperidina.

El siguiente grupo de compuestos identificados en *P. nigrum* se diferencia estructuralmente por la presencia de una piperidina en la amida. De esta forma, los fragmentos comunes corresponden a los iones $[M+H-85]^+$ por la pérdida de piperidina, $[M+H-113]^+$ al perder

la amida, y los anteriores combinados con la pérdida adicional de CH₂O (30 Da) en el dioxometileno, producen los fragmentos respectivos [M+H-115]⁺ y [M+H-143]⁺ (Figura 35).

Este patrón de fragmentación permite identificar el pico 4 ($t_R = 14.12$ min) como piperanina (Friedman et al., 2008; Liu et al., 2015), con [M+H]⁺ = 288.1602 (C₁₇H₂₂NO₃), con fragmentos a m/z 203 [M+H-85]⁺, m/z 175 [M+H-113]⁺, y m/z 145 [M+H-143]⁺, además de m/z 161 y m/z 135 que corresponden a los iones propenilbenzodioxol y metilbenzodioxol respectivamente. El pico 5 ($t_R = 14.32$ min) es el pico mayoritario en el cromatograma y por lo tanto se asigna a la piperina, con [M+H]⁺ = 286.1273 (C₁₇H₂₀NO₃) y fragmentos principales a m/z 201 [M+H-85]⁺, m/z 171 [M+H-115]⁺, m/z 143 [M+H-143]⁺ y m/z 135 (K. Li et al., 2015; Scott et al., 2005).

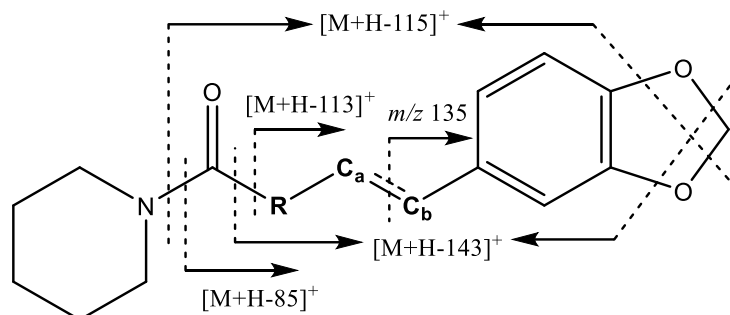
El pico 6 ($t_R = 17.22$ min) posee un ion [M+H]⁺ = 314.1794 (C₁₉H₂₄NO₃), con fragmentos representativos a m/z 199 [M+H-115]⁺ y m/z 161, que permiten su identificación como piperdardina (De Araujo et al., 1997; Flores Quisbert, 2006). El pico 8 ($t_R = 18.44$ min) se identifica como piperetina (Dawid et al., 2012; Friedman et al., 2008), con base al ion [M+H]⁺ observado a m/z 312.1655 (C₁₉H₂₂NO₃) y los fragmentos a m/z 227 [M+H-85]⁺, m/z 199 [M+H-113]⁺ y m/z 169 [M+H-143]⁺.

El pico 12 ($t_R = 20.65$) se identifica como dehidropipernonalina (Dawid et al., 2012), según el ion [M+H]⁺ = 340.1971 (C₂₁H₂₆NO₃) y los fragmentos a m/z 255 [M+H-85]⁺, m/z 227 [M+H-113]⁺, m/z 161 y m/z 135, además del fragmento m/z 179 que se genera por la pérdida del propenilbenzodioxol [M+H-161]⁺. También se identifica la pipernonalina (Giraldo Aricapa, 2012; Lee et al., 2010) en el pico 13 ($t_R = 21.90$ min), con [M+H]⁺ = 342.2122 (C₂₁H₂₈NO₃) y los fragmentos visibles a m/z 229 [M+H-113]⁺, m/z 227 [M+H-115]⁺, m/z 199 [M+H-143]⁺, m/z 161 y m/z 135.

El pico 15 ($t_R = 23.45$ min) posee el ion [M+H]⁺ = 344.2272 (C₂₁H₃₀NO₃), y los fragmentos representativos m/z 201 [M+H-143]⁺ y m/z 135, que permiten su identificación como piperoleína B (Dawid et al., 2012; Salehi et al., 2019). El pico 17 ($t_R = 24.97$ min) corresponde a la piperundecalidina (K. Li et al., 2015), según el ion [M+H]⁺ = 368.2231 (C₂₃H₃₀NO₃) y los fragmentos a m/z 255 [M+H-113]⁺ y m/z 135. El pico 18 ($t_R = 26.39$ min), [M+H]⁺ = 370.2446 (C₂₂H₃₂NO₃) se

asigna al compuesto piperchabamida B, con fragmentos a m/z 285 $[M+H-85]^+$, m/z 161 y m/z 135 (K. Li et al., 2013).

Finalmente, el pico 23 ($t_R = 29.01$ min) es el último de este grupo de compuestos, asignado como piperchabamida C (K. Li et al., 2015) según el ion pseudo-molecular $[M+H]^+ = 396.2575$ ($C_{25}H_{34}NO_3$) y los fragmentos a m/z 311 $[M+H-85]^+$, m/z 283 $[M+H-113]^+$, m/z 161 y m/z 135.



Compuesto	R	C _a -C _b
4		C-C
5		C=C
6		C-C
8		C=C
12		C=C
13		C=C
15		C=C
17		C=C
18		C=C
23		C=C

Figura 35. Estructura y fragmentación de metilendioxfenil amidas con cadena lateral de piperidina.

El pico 22 ($t_R = 28.35$ min) posee un ion $[M+H]^+ = 398.2727$ ($C_{25}H_{36}NO_3$) y presenta fragmentos a m/z 311 $[M+H-87]^+$ que coincide con el rompimiento de la amida unida a una cadena saturada de 5 carbonos, m/z 283 $[M+H-115]^+$ que correspondería a la pérdida de la amida completa, además de m/z 135 (metilbenzodioxol) y m/z 161 (propenilbenzodioxol). Con base en esta información, se asigna este pico a la piperflaviflorina B (Figura 36) (Shi et al., 2017).

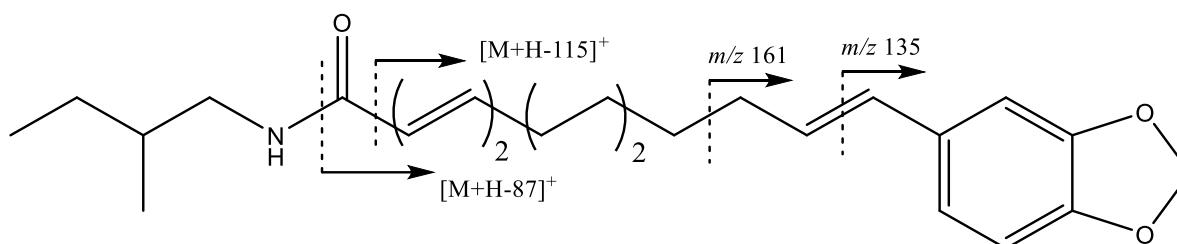


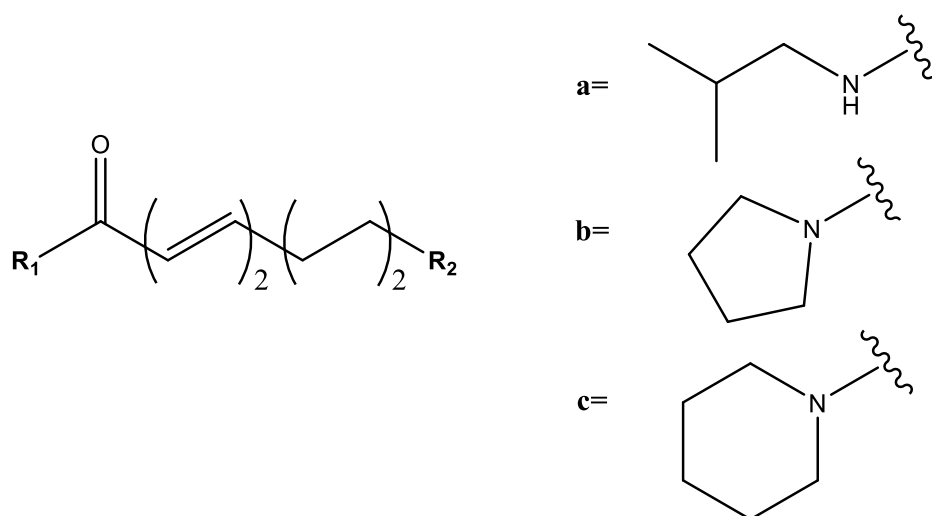
Figura 36. Estructura y fragmentación de la piperflaviflorina B.

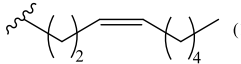
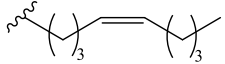
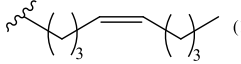

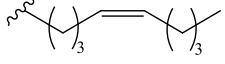
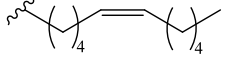
Los picos restantes se diferencian por la ausencia del benzodioxol en su estructura. El primero de éstos es el pico 11 ($t_R = 20.17$ min), con $[M+H]^+ = 224.2015$ ($C_{14}H_{26}NO$) y fragmentos a m/z 208 generado por la pérdida de CH_4 (16 Da), m/z 168 por la pérdida de C_4H_8 (56 Da) proveniente tanto del extremo lineal como de la cadena alifática unida al nitrógeno, y m/z 154 por la pérdida de C_5H_{10} de la cadena lineal, por lo que se identifica como pellitorina (Figura 37) (Ramesh et al., 2015a; Scott et al., 2005).

Los picos 25 ($t_R = 32.14$ min) y 28 ($t_R = 36.20$ min) poseen un ion $[M+H]^+ = 332.2957$ ($C_{22}H_{38}NO$), por lo que se identifican como 1-(octadeca-2E,4E,12/13Z-trienoil)pirrolidina (Figura 37), sin tener información suficiente para distinguir entre los isómeros 12Z y 13Z. Los fragmentos observados son de poca intensidad, y corresponden a m/z 304 por la pérdida de C_2H_4 (28 Da) en la cadena lineal, m/z 261 $[M+H-71]^+$ y m/z 233 $[M+H-99]^+$, que son consistentes con la presencia de la pirrolidina (da Luz et al., 2017; Dawid et al., 2012).

El pico 27 ($t_R = 35.18$ min), $[M+H]^+ = 334.3147$ ($C_{22}H_{40}NO$), es asignado a (2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida (Dawid et al., 2012; Kikuzaki et al., 1993; Wei et al., 2004),

con fragmentos a m/z 306 $[M-H-C_2H_4]^+$, m/z 278 por la pérdida de C_4H_8 (56 Da) de la cadena lineal, y m/z 261 $[M+H-73]^+$ que indica la presencia del isobutilo unido a la amida. De forma semejante, el pico 29 ($t_R = 36.76$ min), $[M+H]^+ = 336.3070$ ($C_{22}H_{42}NO$), se identifica como (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-octadecadienamida (Dawid et al., 2012; K. Li et al., 2013), con fragmentos a m/z 320 $[M+H-CH_4]^+$, m/z 280 $[M+H-C_4H_8]^+$, y m/z 263 $[M+H-73]^+$. El pico 30 ($t_R = 38.56$ min) tiene el ion $[M+H]^+ = 346.3136$ ($C_{23}H_{40}NO$) que corresponde con el compuesto 1-(octadeca-2*E*,4*E*,13*Z*-trienoil)piperidina (Kikuzaki et al., 1993; K. Li et al., 2015), cuyos fragmentos a m/z 318 $[M+H-C_2H_4]^+$ y m/z 261 $[M+H-85]^+$, este último coincidente con la presencia de piperidina en la molécula. Finalmente, el pico 31 ($t_R = 39.92$ min), $[M+H]^+ = 362.3423$ ($C_{24}H_{44}NO$) se identifica como (2*E*,4*E*,14*Z*)-*N*-Isobutil-2,4,14-eicosatrienamida (Kikuzaki et al., 1993), con fragmentos a m/z 306 $[M+H-C_4H_8]^+$ y m/z 289 $[M+H-73]^+$ por la pérdida de isobutilamina (Figura 37).



Compuesto	R ₁	R ₂
11	a	-CH ₃
25	b	
27	a	
28	b	
29	a	
30	c	
31	a	

⁽¹⁾ Sustituyentes intercambiables entre sí.

Figura 37. Estructura de los compuestos con cadena lineal en el extremo C de la amida.

4.2 Contenido de amidas de chile y pimienta

La aplicación de las mejores condiciones establecidas luego del diseño factorial de extracción de capsaicinoides en las muestras de chile, según lo reportado en la sección 3.1,

permitieron proceder posteriormente a la determinación del contenido de las distintas amidas, obteniéndose los resultados que se presentan en la sección 3.3 (Cuadro VII).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos con el diseño factorial mostró que no existía diferencia significativa ($p < 0.05$) para los factores con la interacción solvente con temperatura como la de menor efecto. Al realizar el análisis sin esta última, se observó efecto significativo ($p < 0.05$) para el solvente y para la temperatura, siendo metanol y 90 °C las condiciones que producían los mejores resultados. Asimismo, la interacción entre los tres factores mostró también efecto significativo ($p < 0.05$); por lo que, con base en los resultados, se determinó que las condiciones que permitían obtener los mejores valores de capsaicina son metanol a 90 °C, utilizando 3 ciclos con 5 min de tiempo estático para cada ciclo.

Con el método optimizado anterior se obtuvieron los extractos para las diferentes muestras de chile, como se muestra en la sección 3.3, obteniéndose un mayor rendimiento para el extracto de Cahva. La cuantificación por HPLC-DAD de estos extractos indica que es asimismo Cahva la que tiene un mayor contenido de capsaicina e hidrocapsaicina, así como en amidas totales al expresar los resultados con base en la muestra seca, como se muestra en el Cuadro VII en la sección 3.3.

Los reportes de la literatura sobre el contenido de capsaicinoides en *C. annuum* presentan contenidos muy variables. En este sentido, las muestras analizadas en este trabajo poseen valores que se encuentran dentro del rango de lo reportado para esta especie, como se resume en el Cuadro XXXIX. La muestra Cahva resulta ser la mejor de las estudiadas, con un contenido de capsaicina de 350.9 ± 5.7 mg/100 g que supera el valor reportado en los estudios de Alvarez-Parrilla et al. (2011) y Thomas et al. (1998).

Para la dihidrocapsaicina, los resultados se encuentran asimismo dentro de los rangos reportados en las referencias, destacando nuevamente la muestra Cahva con un resultado aproximadamente tres veces mayor a las muestras Cahfo y Cahpn. Entre ambos compuestos principales se mantiene la tendencia esperada, donde la capsaicina es el compuesto mayoritario y la dihidrocapsaicina el segundo compuesto en importancia (Zahra et al., 2016), en este caso con valores que representan un 22-38% de la capsaicina.

Es importante destacar que en la muestra Cahfo se reporta la cuantificación de una amida adicional respecto a la literatura, la nordihidrocapsaicina, con un contenido de 7.23 ± 0.03 mg/100 g muestra.

Cuadro XXXIX. Valores de los capsaicinoides principales (en mg/100 g muestra seca), reportados en la literatura para *Capsicum spp.*

Referencia	(Garcés-Claver et al., 2006)	(Hamed et al., 2019)	(Alvarez-Parrilla et al., 2011)	(Thomas et al., 1998)
Capsaicina	0.9-664	4.9-482	25-231	8.9-240
Dihidrocapsaicina	0.8-372	1.4-216	22-150	10-230

En el caso de la extracción de piperamidas de las distintas muestras de *P. nigrum*, la aplicación de las mejores condiciones de extracción establecidas luego del diseño factorial, según lo reportado en la sección 3.1, permitió la determinación del contenido de las distintas amidas como se muestra en el Cuadro IX de la sección 3.3.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos indicó que no existía diferencia significativa ($p < 0.05$) para la temperatura, solvente, ciclos y tiempos estáticos, sin embargo, el análisis de los gráficos de interacciones dobles permitió determinar los factores y niveles evaluados. Así, las interacciones solvente-ciclos y temperatura-ciclos, indicaron que el acetato de etilo y 5 ciclos con 6 min de tiempo estático, así como que esta cantidad de ciclos y una temperatura de 25° C correspondían a los mejores efectos en la extracción. Considerando estos resultados, se seleccionaron estas condiciones que permitían obtener los mejores valores de piperina.

Con este método se obtuvieron los extractos de las tres muestras de *P. nigrum* en estudio, con rendimientos de extracción que muestran una ligera variación entre muestras. Sin embargo, en la cuantificación de los compuestos principales se amplían las diferencias, principalmente en

el compuesto mayoritario principal, piperina, cuyo contenido en la muestra Pnien es entre un 65% y un 75% mayor a las otras dos muestras.

El contenido total de piperamidas también es significativamente mayor en la muestra Pnien, un 66% más que la muestra más pobre (Pnidi) y un 44% superior a la muestra intermedia (Pnife).

Al comparar los resultados con la literatura, mostrados en el Cuadro XL, se observa que la muestra Pnien contiene más piperina que lo reportado por Ramesh et al. (2015) y Rao et al. (2011), siendo los valores de piperina encontrados para las muestras Pnidi y Pnife menores a estos reportes y al de Friedman et al. (2008), mientras que en el caso de Pnien el valor se encuentra dentro del rango de contenido descrito por este último estudio.

Con respecto a otras piperamidas reportadas con mayor frecuencia en la literatura (Cuadro XL), es destacable que tanto la pellitorina como la guineensina se encuentran en las tres muestras costarricenses en valores muy superiores, por ejemplo para esta última entre cinco y ocho veces mayor a los reportados (Ramesh et al., 2015a; Rao et al., 2011) y para la piperilina, las muestras Pnidi y Pnife presentan valores menores mientras que Pnien está dentro de lo descrito por Friedman et al. (2008).

Cabe remarcar la importancia del alto contenido de guineensina en las tres muestras costarricenses dado el potencial que exhibe este compuesto como inhibidor de la captación de endocannabinoides (Nicolussi et al., 2014).

Cuadro XL . Valores de las piperamidas principales (en mg/100 g muestra seca), reportados en la literatura para *P. nigrum*.

Compuesto	(Friedman et al., 2008)	(Ramesh et al., 2015a)	(Rao et al., 2011)
Tricostachina/piperilina	90 – 430	445	428.8
Piperina	3 320 – 5 220	3 647	3 566
Piperanina	40 – 60		
Piperlonguminina	30 – 90		
Dihidropiperlonguminina		2 093	
Guineensina		51	48.9
Pellitorina		225	50.4
Piperetina	190 – 420		

En cuanto a las cuatro amidas presentes presentes en un solo reporte de la literatura, a saber, dihidropiperlongumina (Ramesh et al., 2015b), piperlongumina, piperetina y piperanina, (Friedman et al., 2008), la primera no se reporta en nuestro estudio mientras que para la piperlongumina las tres muestras costarricenses coinciden con el intervalo de la literatura y es la muestra Pnien la que se encuentra dentro del rango reportado para la piperetina. Por último, el contenido de la piperanina es superior tanto en la muestra Pnife y especialmente en Pnien que presenta un valor dos a tres veces más alto que lo reportado en la literatura (Friedman et al., 2008).

Un aspecto especialmente importante es el número de piperamidas cuantificables encontradas en las tres muestras costarricenses, ya que, mientras que en la literatura se reportan un máximo de cinco compuestos, en este análisis fue posible cuantificar 15 piperamidas en las muestras Pnien y Pnife, y 13 en la muestra Pnidi, incluyendo algunas con bioactividades reportadas como la refractomidas A y B (Nicolussi et al., 2014), mostrándose asimismo la alta diversidad en la composición de las muestras estudiadas que además repercute en la

cuantificación total de piperamidas, estando en todos los casos por encima de 5 000 mg por cada 100 g de muestra seca.

4.3 Caracterización por HPTLC de compuestos en *Piper nigrum* costarricense

El análisis cualitativo realizado por HPTLC, descrito en la sección 3.4, es coincidente con el perfil esperado para *P. nigrum*, donde en detección UV a 254 nm se destacan la banda de piperina a $R_f = 0.18$ y otra banda importante a $R_f = 0.50$, con otras tres bandas de menor intensidad en $R_f 0.35-0.45$. La derivatización además presenta otras señales con tonos rosados y rojizos entre $R_f 0.55-0.9$, manteniéndose visibles las señales de piperina a $R_f = 0.18$ con tono verde, y la banda a $R_f = 0.5$ en color violeta (HPTLC Association, 2018).

Esta distribución de señales permite también demostrar diferencias en el perfil químico del extracto de *P. nigrum* con respecto a los extractos obtenidos de otras plantas que son similares visualmente. Estas diferencias se aprecian principalmente en la piperina ($R_f = 0.18$) y la banda a $R_f = 0.45$ observables bajo luz UV a 254 nm (Figura 13a), pero se hacen aún más palpables posterior a la derivatización (Figura 13, c y d).

La posición y resolución de la banda de la piperina permite además realizar la cuantificación por métodos ópticos, ya sea con perfil de pico (bajo luz de 254 nm) o densitometría (bajo luz de 366 nm), siendo la última la que brinda los resultados más altos para el mismo extracto, pues la piperina posee un máximo de absorción cercano (340 nm) que, junto con el contraste entre la señal y el color de fondo, permite una mejor distinción del compuesto.

Al comparar además las muestras analizadas, se observa también que las muestras de Costa Rica tienen un mayor contenido porcentual de piperina (4.55% en Pnien, 3.93% en Pnife) que la muestra de Vietnam (2.88%), o que otros tipos de pimienta con origen también vietnamita (pimienta blanca 3.59%, pimienta amarilla 2.49%, pimienta roja 1.30%) (Cuadro XLI), pero además se encuentra por encima del valor mínimo (2.5%) establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP-NF, 2015). Se requieren estudios posteriores para comprobar un contenido

mayor de piperina en las muestras de pimienta negra de Costa Rica respecto a las obtenidas en otras regiones, como se ha mencionado, aunque sí se mantiene la tendencia de más piperina en la pimienta negra respecto a otras presentaciones de *P. nigrum*.

Cuadro XLI. Comparación en la cuantificación de piperina entre las muestras de *P. nigrum* de Costa Rica, con muestras de otros países y/o tipos de pimienta, por perfil de pico de imagen y por densitometría.

Muestra	% piperina	
	Perfil de pico (254 nm)	Densitometría (331 nm)
Pimienta negra (Pnien)	3.63%	4.55%
Pimienta negra (Pnife)	3.37%	3.93%
Pimienta negra (Vietnam)	2.83%	2.88%
Pimienta blanca (Vietnam)	3.58%	3.59%
Pimienta roja (Vietnam)	1.28%	1.30%
Pimienta amarilla (Vietnam)	2.50%	2.49%

4.4 Obtención de piperina y de guineensina a partir de *P. nigrum* costarricense

La obtención de algunas amidas, como la piperina y guineensina, son de especial interés por sus propiedades biológicas, y en el caso de la primera utilizarse asimismo en la preparación de materiales complejos para aumentar la solubilidad y por ende la biodisponibilidad de medicamentos (Wilhelm-Romero et al., 2022), mientras que la guineensina al constituir un inhibidor natural del sistema endocannabinoide (Nicolussi et al., 2014). Al respecto de la última, los bajos rendimientos obtenidos en la literatura aunados al potencial e interés generado han determinado el alto costo de esta amida, la que se ofrece comercialmente por ejemplo por Sigma-Aldrich (SMB01002) a un costo de \$406 por 1 mg de compuesto (Merck KGaA, 2022).

Con el propósito de determinar el potencial de las muestras de *P. nigrum* costarricenses como fuente que permita aislar la guineensina a partir de los extractos en estudio, se realizó la separación por UPLC semipreparativa, según lo descrito en la sección 3.6, en un extracto de la muestra Pnien, que es con la que se obtenía el mejor valor en la cuantificación por UPLC-DAD.

Luego del análisis de las distintas fracciones de la separación semipreparativa, se identificaron los 3 compuestos que se resumen en el Cuadro XLII, a partir de la comparación de sus espectros de masas con los obtenidos en el análisis UPLC-QTOF ESI MS descritos en la sección 3.2., complementados con espectroscopía RMN.

Cuadro XLII. Identificación de piperamidas en las fracciones de la separación semipreparativa de Pnien.

Fracción	[M+H] ⁺	Identificación	# Compuesto
6	384	Guineensina	20
8	334	(2E,4E,13Z)-N-isobutil-2,4,13-octadecatrienamida	27
9	336	(2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida	29

En efecto, los análisis de RMN en ¹H y ¹³C permitieron confirmar señales características de dichos compuestos, tal como las señales de ¹H-RMN a δ 3.15 (t, J=6.4 Hz, H-1') y 0.91 (d, J=6.7 Hz, H-3', 4') ppm, características del grupo isobutilo en la dienamida y trienamida (K. Li et al., 2013). Así como las señales en ¹H-RMN a δ 2.00 (m) y 5.34 (m) ppm, que corresponden a protones alílicos y vinílicos de los dobles enlaces no conjugados y los dos pares de señales en ¹³C-RMN a δ 129.6 and 129.8 ppm y a δ 128.3 y 130.0 ppm, correspondientes en estas dos moléculas a los dobles enlaces aislados (Dawid et al., 2012).

En el caso de la fracción 9, el grupo isobutilo del compuesto (2E,4E)-N-isobutil-2,4-octadecadienamida (Figura 38), muestra picos con desplazamientos a 20.1ppm (C-3',4'), 28.6 ppm (C-2') y 46.9 ppm (C-1'). Se observan 4 picos en la región de oleofinas, coincidente con la presencia de dos enlaces dobles, en adición al pico a 166.4 ppm (C-1) que corresponde al

carbonilo. Adicionalmente, en el espectro solo se identifican dos señales de metilos a 20.1 ppm (C-3',4') y 14.1 ppm (C-18), correspondientes a ambos extremos del compuesto y que descartan la presencia de alguna ramificación adicional al isobutilo.

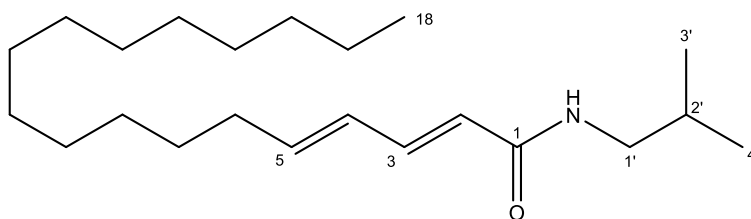


Figura 38. Estructura de (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-octadecadienamida, en fracción 9.

En la fracción 8, a pesar de ser una mezcla de compuestos, fue posible identificar el (2*E*,4*E*,12*Z*)-*N*-isobutil-2,4,12-octadecatrienamida como componente mayoritario. El análisis de los picos más importantes, tanto en ^{13}C -RMN como en ^1H -RMN, permitió su asignación de forma semejante al (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-octadecadienamida (Figura 39), con las señales de isobutilo a 20.1 ppm (C-3',4'), 28.6 ppm (C-2') y 47.0 ppm (C-1'), y el pico del carbonilo a 166.6 ppm (C-1). La diferencia más significativa ocurre en los carbonos alifáticos, con un total de 6 en esta región, que indican la presencia de 3 enlaces dobles en la estructura.

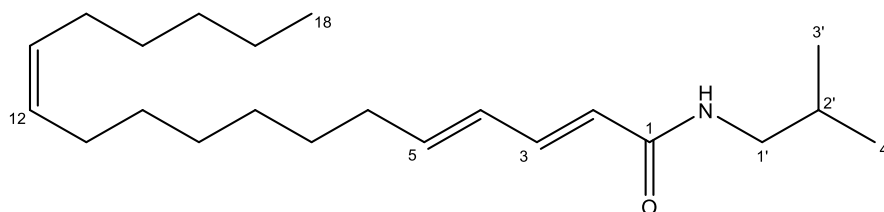


Figura 39. Estructura de (2*E*,4*E*,12*Z*)-*N*-isobutil-2,4,12-octadecatrienamida en la fracción 8.

Si bien estos resultados son propicios para el trabajo de aislamiento de estos compuestos, según el objetivo planteado, el estudio se concentró en la fracción 6 hacia el aislamiento de la guineensina, en la que se obtuvieron 12.8 mg de un sólido blanco, cuya identificación fue confirmada tanto por ESI-MS al coincidir el ion pseudo-molecular $[M+H]^+$ a m/z 384, como por experimentos de RMN en una dimensión.

Por un lado, los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figura 17, a y b) de la fracción 6, confirmaron la identificación de la guineensina, con señales (Cuadro XIII) que coinciden con lo reportado previamente en la literatura (K. Li et al., 2013) y entre las que destacan 100.90 ppm (^{13}C -RMN) y 5.95 ppm (^1H -RMN) que corresponden al metileno del metilbenzodioxol (O-CH₂-O), los picos en ^{13}C -RMN a 20.1 ppm (C-3'',4''), 28.6 ppm (C-2'') y 47.0 ppm (C-1'') con sus respectivas señales en ^1H -RMN a 0.92 ppm (H-3'',4''), 1.82 ppm (H-2'') y 3.16 ppm (H-1'') que son indicativas de un grupo isobutilo unido a un átomo electronegativo, en este caso el nitrógeno de la amida; y adicionalmente en ^{13}C -RMN se ubican 12 picos en la región de olefinas que son consistentes con la presencia de un anillo aromático y tres enlaces dobles.

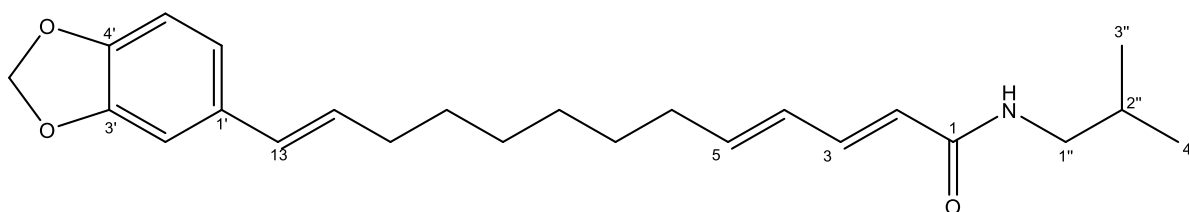


Figura 40. Estructura de la guineensina.

Comparando con los resultados de rendimiento obtenidos en la literatura, Ramesh et al. (2015) analizan el extracto metanólico de *P. nigrum* por HPTLC y obtienen 51 mg de guineensina/100 g de muestra seca, mientras que Rao et al. (2011) obtienen 48.9 mg/100 g de muestra seca para el extracto metanólico analizado por HPLC. Ambos reportes son menores a la cuantificación por UHPLC obtenida en el presente trabajo. En cuanto al compuesto aislado, Nicolussi et al. (2014) reportaron una extracción en cloroformo con posteriores fraccionamientos a través de cromatografía de columna y HPLC preparativo, obteniendo 2.17 mg de guineensina

aislada/100 g de muestra seca, un valor significativamente menor al obtenido en el presente trabajo de 109 mg de guineensina aislada/100 g de muestra seca.

En lo que respecta al aislamiento de piperina, según lo descrito en la sección 3.5, la cromatografía de columna permitió obtener varias fracciones con un compuesto puro, que al unir las sumaron un total de 435.2 mg, y cuyo análisis RMN confirmó como piperina (Figura 41). En cuanto a los picos observados, destaca la presencia de 3 protones aromáticos con un patrón de desdoblamiento de un anillo 1,3,4-trisustituido, y otros 4 protones en la región de olefinas con acoplamientos coincidentes con alquenos *trans*. Esto se complementa con la presencia de 10 señales en ^{13}C -RMN que se encuentran en la región de dobles enlaces, una señal a campo bajo que corresponde al carbonilo, y un pico a 101.6 ppm que se debe al dioxometileno.

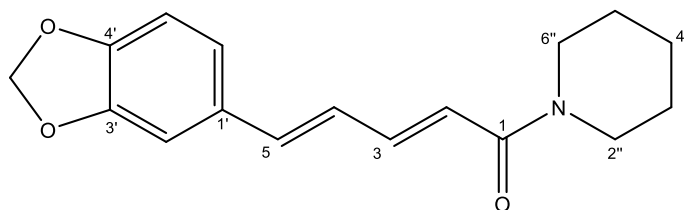


Figura 41. Estructura de la piperina.

La piperina fue aislada con adecuada pureza para preparar exitosamente materiales orgánicos multicomponentes (MOMs) con los fármacos irbesartan y lovastatina así como con la curcumina, incidiendo positivamente en la solubilidad de éstos y mejorándola con respecto a los compuestos puros (Wilhelm-Romero et al., 2022).

4.5 Fraccionamiento del extracto de *C. annuum* e identificación por RMN

En el caso de las amidas de *C. annuum*, como se ha mencionado, dada su bioactividad también existe especial interés, por ejemplo, en la dihidrocapsaicina, para la que estudios

recientes sugieren propiedades neuroprotectivas contra la isquemia cerebral y reperfusión a través de la atenuación de la barrera hematoencefálica (Janyou et al., 2017).

De esta forma, se trabajó en la separación semipreparativa de amidas de chile, como se describe en la sección 3.7. En primera instancia, se obtuvo capsaicina (Figura 42) como compuesto mayoritario en la fracción 3. La identificación es posible por los picos observados en los espectros ^{13}C -RMN y ^1H -RMN. En el primero, de forma general, se aprecia una señal de carbonilo, 8 carbonos en la región de olefinas, y 8 carbonos alifáticos entre los cuales se distingue el metoxilo a 55.9 ppm y un carbono con aproximadamente el doble de intensidad de los demás a 22.6 ppm.

El espectro ^1H -RMN permite identificar este último pico como dos grupos $-\text{CH}_3$ equivalentes, con un pico 0.95 ppm que desdobla como doblete y sugiere la presencia de un isopropilo $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Otras señales características son el pico 3.88 ppm singulete que corresponde al metoxilo, el pico a 4.35 ppm de los protones H-7' que desdobla como doblete por acoplamiento con el protón de la amida, y los picos a 6.7-6.9 ppm que tienen un patrón coincidente con un anillo aromático 1,3,4-trisustituido, por lo que los dos carbonos olefínicos restantes corresponden al enlace doble C6-C7 con la correspondiente señal en ^1H -RMN a 5.35 ppm (Gavilán et al., 2016).

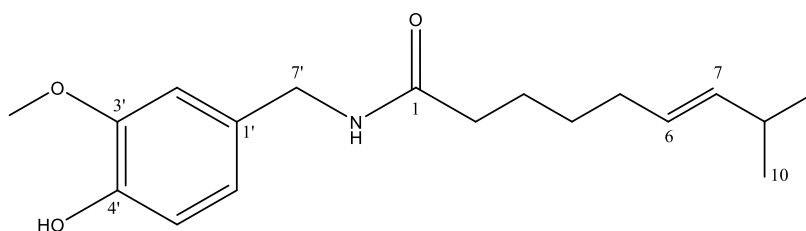


Figura 42. Estructura de la capsaicina.

Para la fracción 6, el compuesto mayoritario es la homocapsaicina II (Figura 43). Este compuesto tiene similitud con la capsaicina de la fracción 3, como las señales aromáticas con desdoblamiento coincidente con un anillo 1,3,4-trisustituido, los picos del metoxilo (55.9 ppm y 3.89 ppm en singulete), las señales del C-7' (43.5 ppm y el doblete a 4.37 ppm), y la presencia

total de 8 carbonos olefínicos que indican la presencia de un doble enlace adicional al anillo aromático. Adicional a éstas, se ubican 9 picos en la región alifática, en donde, a diferencia de las otras fracciones, no se observa la presencia de la terminación isopropilo, sino un sistema de dos -CH₃ terminales cuyas señales en ¹H-RMN se traslapan entre sí en un multiplete a 0.89 ppm (Gómez-Calvario et al., 2016).

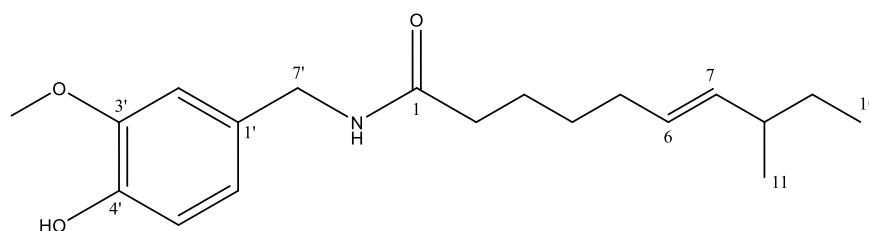


Figura 43. Estructura de la homocapsaicina II.

Finalmente, se logra efectivamente obtener 16.1 mg de dihidrocapsaicina (Figura 44), en la fracción 5, en la que se observan señales para un único compuesto. El patrón de señales es similar al observado para la fracción 3 (capsaicina), con la salvedad de que en ¹³C-RMN hay solamente 6 picos en la región olefínica, y en cambio se ubican 10 picos en la zona alifática. En ¹H-RMN, los protones olefínicos también poseen el patrón de desdoblamiento correspondiente a un anillo aromático 1,3,4-trisustituido, se observa el singulete a 3.89 ppm del metoxilo, el doblete a 4.37 ppm (H-7') y el pico 0.87 ppm en doblete que corresponde a los -CH₃ del isopropilo terminal (Gómez-Calvario et al., 2016).

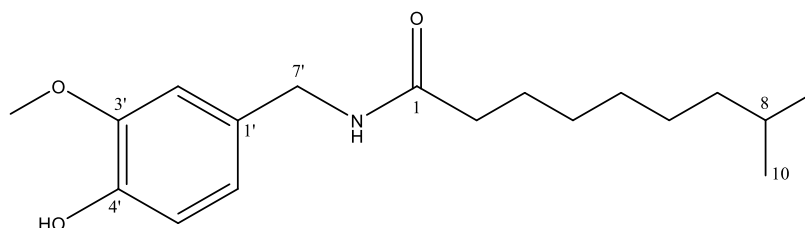


Figura 44. Estructura de la dihidrocapsaicina.

4.6 Caracterización HRMS de polifenoles de *C. annuum* y *P. nigrum* costarricenses

La caracterización de los polifenoles de *C. annuum*, a través de UPLC-ESI-MS utilizando un Orbitrap XL, cuyos resultados se resumen en el Cuadro XXVII de la sección 3.9, permitió la identificación tentativa de 14 compuestos.

El pico 1 ($t_R = 1.70$ min) se asignó al ácido quínico (Figura 45). El ion molecular $[M-H]^-$ a m/z 191.0562 ($C_7H_{11}O_6$) produce los fragmentos a m/z 173 por la pérdida de H_2O , además de m/z 171, 127, 109, 93 y 85, los cuales han sido previamente reportados para este compuesto (Fathoni et al., 2017).

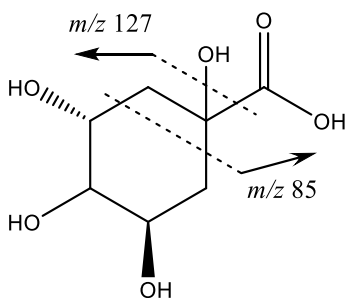


Figura 45. Estructura del ácido quínico y fragmentaciones importantes.

El pico 2 ($t_R = 6.81$ min) presenta un ion $[M-H]^-$ a m/z 223.0249 ($C_{10}H_7O_6$), asignado como ácido sinápico (Figura 46). El fragmento a m/z 193 se explica por la pérdida de un metoxilo (CH_2O , 30 Da), y a partir de éste se generan los fragmentos a m/z 175 por la pérdida de H_2O (18 Da), m/z 165 por la pérdida de CO (28 Da), m/z 149 por la pérdida de CO_2 (44 Da) en el ácido carboxílico, y m/z 135 por el rompimiento α del ácido (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016).

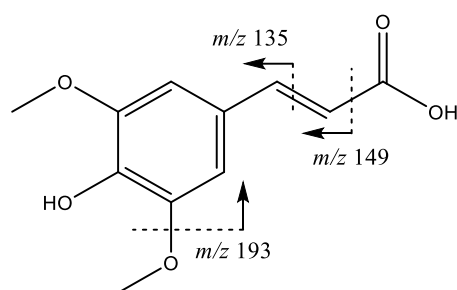


Figura 46. Estructura y fragmentos del ácido sinápico.

El pico 3 ($t_R = 7.65$ min) posee un ion $[M-H]^- = 329.0879$ ($C_{14}H_{17}O_9$), identificado como vanilloil *O*-hexosa (Figura 47). El compuesto presenta un fragmento a m/z 209 por el rompimiento del heterociclo, y el fragmento principal a m/z 167 correspondientes a la pérdida de la hexosa $[M-H-162]^-$ (Vallverdú-Queralt et al., 2011). A partir de este último, se produce el fragmento a m/z 123 al perder el carboxilato en forma de CO_2 (44 Da) (Grieman et al., 2015).

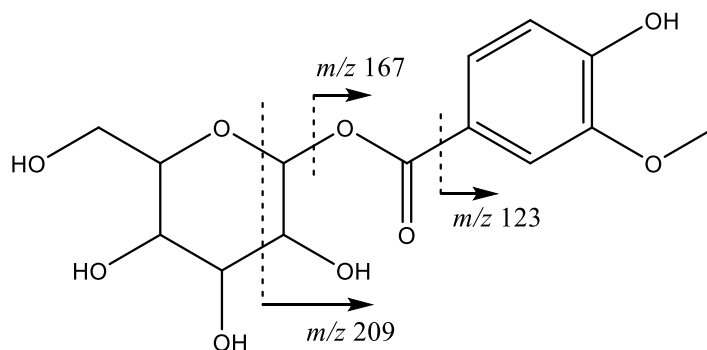
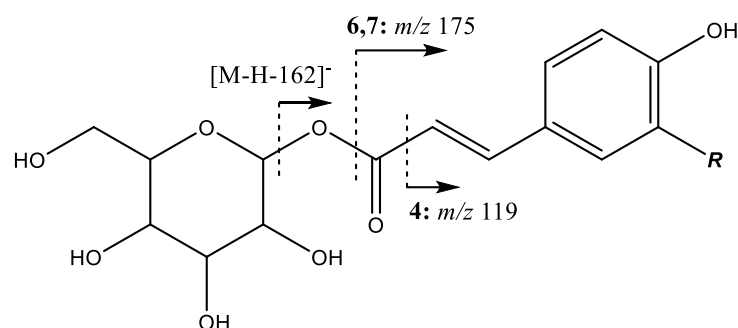


Figura 47. Estructura y fragmentos principales del vanilloil *O*-hexosa.

El pico 4 ($t_R = 10.44$ min) presenta un ion pseudo-molecular $[M-H]^-$ a m/z 325.0929 ($C_{15}H_{17}O_8$) que corresponde a cumaroil *O*-hexosa (Figura 48). El fragmento a m/z 163 es resultado de la pérdida de la hexosa $[M-H-162]^-$, y la subsecuente descarboxilación (44 Da) genera el fragmento a m/z 119 (Sensen Li et al., 2016). Los picos 6 ($t_R = 12.63$ min) y 7 ($t_R = 13.16$ min) se identificaron como isómeros del feruloil *O*-hexóxido (Figura 48) por su ion $[M-H]^- = 355.1034$ ($C_{16}H_{19}O_9$), además de los fragmentos a m/z 193 generado por la pérdida de la hexosa $[M-H-162]^-$

, y m/z 175 por la pérdida de *O*-hexosa $[M-H-180]^-$. A partir de este último, la pérdida de metilo $[M-H-180-CH_3]^-$ en el metoxilo produce el fragmento a m/z 160 (Moco et al., 2007).



Compuesto	<i>R</i>
4	-H
6, 7	-O-CH ₃

Figura 48. Estructura y fragmentación para coumaroil *O*-hexosa y feruloil *O*-hexosa.

El pico 5 ($t_R = 10.93$ min) muestra un ion $[M-H]^- = 353.0881$ ($C_{16}H_{17}O_9$). El compuesto se identifica como ácido cafeoilquínico (Figura 49) con base en los fragmentos a m/z 191 y m/z 173, que corresponden de manera respectiva al ácido quínico por la pérdida del cafeoil $[M-H-162]^-$ (Deng & Yang, 2013) y su posterior deshidratación $[M-H-162-H_2O]^-$ (Barros et al., 2012). Asimismo, los fragmentos a m/z 171, 127, 109, 93 y 85 son congruentes con el patrón de fragmentación del ácido quínico (Fathoni et al., 2017).

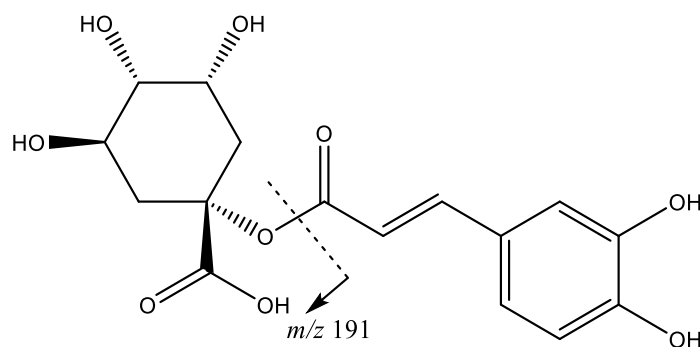
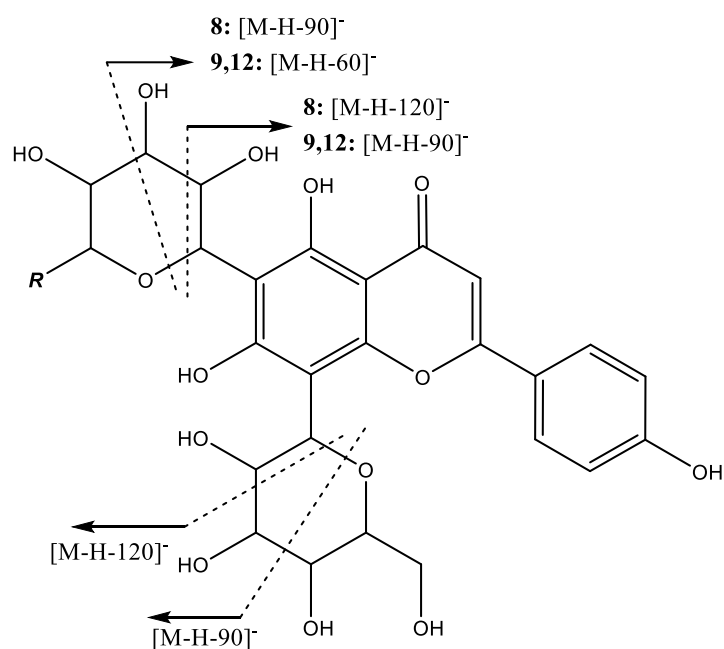


Figura 49. Estructura y fragmentación del ácido cafeoilquínico.

El pico 8 ($t_R = 14.37$ min), cuyo ion $[M-H]^-$ se presenta a m/z 593.1501 ($C_{27}H_{29}O_{15}$), se asignó a la apigenina di-C-hexósido (Figura 50). El fragmento a m/z 575 se debe a la pérdida de agua $[M-H-H_2O]^-$, mientras que los fragmentos a m/z 503 $[M-H-90]^-$ y m/z 473 $[M-H-120]^-$ se originan por el rompimiento del heterociclo del carbohidrato. El pico a m/z 383 proviene de la fragmentación en ambos glicósidos $[M-H-120-90]^-$, al igual que ocurre con el fragmento a m/z 353 $[M-H-120-120]^-$ (Silva et al., 2014).

El pico 9 ($t_R = 15.21$ min) y el pico 12 ($t_R = 16.16$ min) se identificaron como isómeros de apigenina C-hexosil-C-pentósido (Figura 50), dado el ion $[M-H]^- = 563.1406$ ($C_{26}H_{27}O_{14}$), y los fragmentos a m/z 473 $[M-H-90]^-$ y m/z 443 $[M-H-120]^-$ que son resultado de la ruptura de la hexosa. El rompimiento del heterociclo en la pentosa sigue el mismo patrón de la hexosa, pero con un carbono hidroxilado menos (CH_2O , 30 Da), generando entonces los fragmentos a m/z 503 $[M-H-60]^-$ y nuevamente m/z 473 $[M-H-90]^-$. La fragmentación simultánea de la hexosa y la pentosa produce los fragmentos a m/z 383 $[M-H-90-90]^-$ o $[M-H-120-60]^-$, y m/z 353 $[M-H-120-90]^-$ (Geng et al., 2016).



Compuesto	<i>R</i>
8	-CH ₂ OH
9, 12	-H

Figura 50. Estructura de las apigenina C-glicosiladas con sus fragmentaciones características.

El pico 10 ($t_R = 15.69$ min), con $[M-H]^- = 447.0937$ ($C_{21}H_{19}O_{11}$) se asigna a luteolina C-hexósido (Figura 51), con fragmentos principales a m/z 357 $[M-H-90]^-$ y m/z 327 $[M-H-120]^-$, correspondientes al rompimiento de la hexosa (Barros et al., 2012).

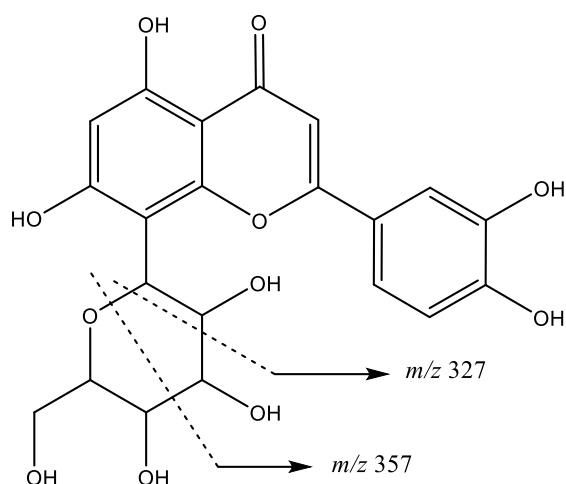


Figura 51. Estructura y fragmentación de la luteolina C-hexósido.

El pico 11 ($t_R = 15.79$ min), de ion $[M-H]^- = 623.1615$ ($C_{28}H_{31}O_{16}$), se identifica como isoramnetina *O*-rutinosido. El fragmento de la aglicona se observa a m/z 315 y la pérdida sucesiva del metilo (CH_3 , 15 Da) del metoxilo resulta en el fragmento a m/z 300, como se observa en la Figura 52 (Barros et al., 2012).

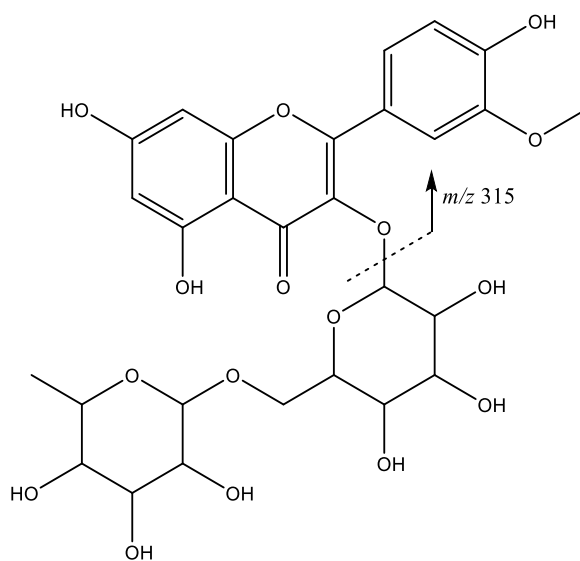
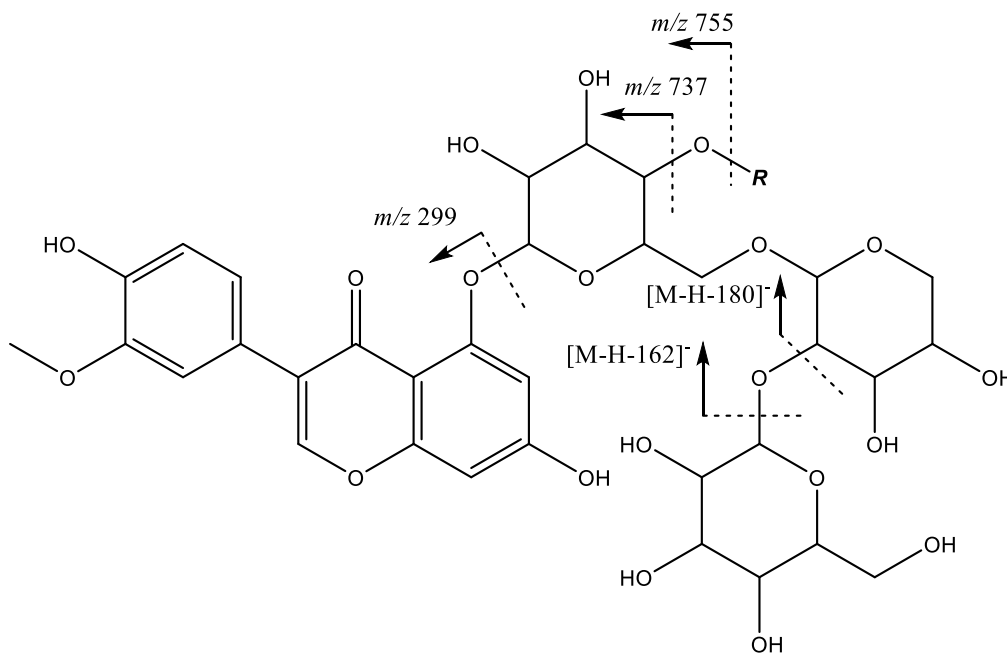


Figura 52. Estructura y patrón de fragmentación de la Isoramnetina *O*-rutinosido.

Finalmente, los picos 13 ($t_R = 18.71$ min) y 14 ($t_R = 19.91$ min) presentan sus iones psuedomoleculares $[M-H]^-$ respectivos a m/z 755.2042 ($C_{33}H_{39}O_{20}$) y m/z 797.2149 ($C_{35}H_{41}O_{21}$), por lo que se identificaron como derivados del 3-*O*-metilrobol (Figura 53). Los fragmentos del pico 13 a m/z 593 y m/z 575 representan la pérdida de una hexosa $[M-H-162]^-$ y de una *O*-hexosa $[M-H-180]^-$, respectivamente. Por otro lado, el pico 14 produce los fragmentos a m/z 755 y a 737 debido a la pérdida de un grupo acetilo ($COCH_3$, 42 Da) y su posterior deshidratación (H_2O , 18 Da), además de la pérdida de una hexosa que origina el fragmento a m/z 635 $[M-H-162]^-$.

Asimismo, ambos compuestos presentan el fragmento a m/z 299 correspondiente al metilrobol, el cual sufre una pérdida de metilo para producir el fragmento a m/z 284. Por lo tanto, el pico 13 se asigna al 3-*O*-metilrobol hexosil-pentosil-hexósido, y el pico 14 al 3-*O*-metilrobol hexosil-pentosil-acetilhexósido respectivamente (Said et al., 2017).



Compuesto	<i>R</i>
13	-H
14	-COCH ₃

Figura 53. Estructura y principales fragmentos para los compuestos derivados del metilrobol.

Por su parte, de los polifenoles de *Piper nigrum* analizados a través de UPLC- ESI MS con un equipo Orbitrap XL (Cuadro XXVIII de la sección 3.8), se realizó la identificación tentativa de 14 compuestos.

El pico 1 ($t_R = 1.63$ min) muestra un ion $[M-H]^-$ a m/z 341.1088 ($C_{12}H_{21}O_{11}$) que coincide con la sacarosa. Los fragmentos a m/z 179 y m/z 161 son consistentes con la pérdida de un hexósido $[M-H-162]^-$ y un *O*-hexósido $[M-H-180]^-$, respectivamente (Figura 54). Además, los picos observados a m/z 143 y m/z 113 se han reportado previamente como resultado de la fragmentación de glucosa (Beneito-Cambra et al., 2009).

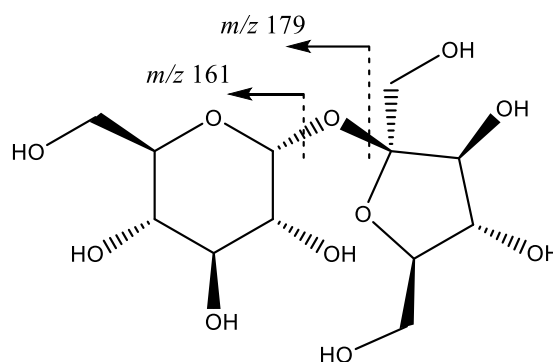


Figura 54. Estructura y fragmentación principal de la sacarosa.

El pico 2 ($t_R = 1.70$ min) se identificó como el ácido 4-*O*-metilglucónico (Figura 55), cuyo ion $[M-H]^-$ se observa a m/z 209.0665 ($C_7H_{13}O_7$). El fragmento observado a m/z 159 $[M-H-H_2O-CH_3OH]^-$ se origina por la pérdida del metoxilo y una molécula de agua adicional, mientras que la pérdida adicional de un carbono hidroxilado (CH_2O , 30 Da) produce el fragmento a m/z 129 $[M-H-H_2O-CH_3OH-CH_2O]^-$ (Deng & Yang, 2013; Sensen Li et al., 2016).

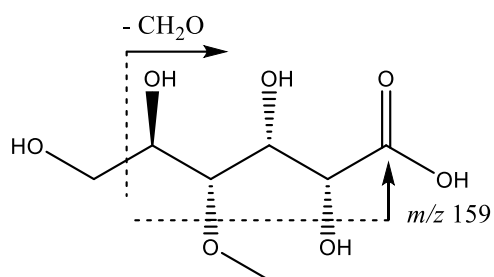


Figura 55. Estructura del ácido 4-*O*-metilglucónico y representación de sus fragmentos principales.

El pico 3 ($t_R = 5.13$ min), $[\text{M}-\text{H}]^- = 323.1340$ ($\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_9$) corresponde a la periplobiosa (Figura 56). El espectro muestra los fragmentos a un fragmento a m/z 179 y m/z 161 coincidentes con la presencia de la hexosa, y el fragmento a m/z 143 $[\text{M}-\text{H}-180]^-$ consistente con la pérdida de *O*-hexosa (Brown et al., 1971).

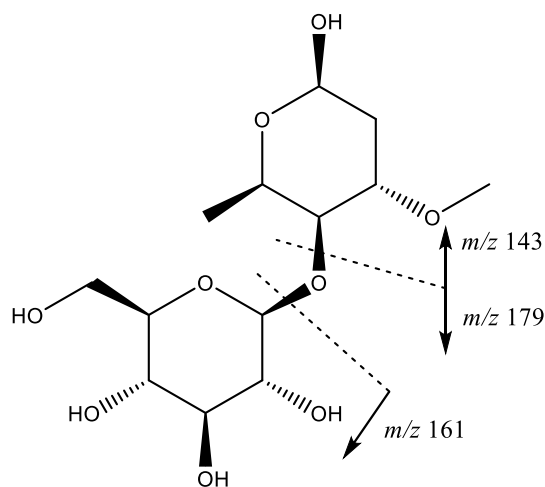
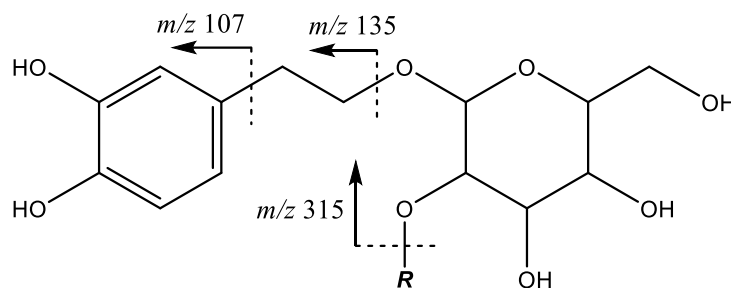


Figura 56. Estructura y fragmentos principales de la periplobiosa.

Los picos 4, 5, 6 y 7 se identificaron como derivados glicosilados del hidroxitirosol. El pico 4 ($t_R = 6.25$ min) muestra un ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 315.1079 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_8$), asignado como hidroxitirosol-*O*-hexósido (Figura 57), que presenta un fragmento a m/z 135 $[\text{M}-\text{H}-180]^-$ que coincide con la

pérdida de *O*-hexosa (Cardoso et al., 2005), y un fragmento posterior a m/z 107 que coincide con la pérdida de la cadena lateral del tirosol (CH_2CH_2 , 28 Da) (Mazzotti et al., 2012).

El pico 5 ($t_R = 6.50$ min) presenta ion psuedo-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 477.1615 ($\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_{13}$) asignado como hidroxitirosol-di-*O*-hexósido (Figura 57), con un fragmento a m/z 315 como resultado de la pérdida de una hexosa, y un fragmento a m/z 135 que demuestra el mismo patrón de fragmentación que el pico 4. El pico 6 ($t_R = 8.28$ min) posee un ion $[\text{M}-\text{H}]^- = 447.1501$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_{12}$) coincidente con hidroxitirosol-*O*-pentosil-*O*-hexósido, corroborado por la presencia de los fragmentos a m/z 315 y m/z 135. El pico 7 ($t_R = 9.26$ min), $[\text{M}-\text{H}]^- = 461.1657$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_{12}$), asignado al hidroxitirosol-*O*-ramnosil-*O*-hexósido, da origen a un fragmento a m/z 315 por la pérdida de la ramnosa, y al fragmento a m/z 135 por la pérdida posterior de *O*-hexosa (Jia et al., 2015).



Compuesto	R
4	-H
5	-hexosa ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$)
6	-pentosa ($\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_4$)
7	-ramnosa ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4$)

Figura 57. Estructura y fragmentación de los derivados del hidroxitirosol.

El pico 8 ($t_R = 10.19$ min), cuyo ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ se encuentra a m/z 443.1924 ($\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_{10}$), se asignó al ácido dihidrofaseico *O*-hexósido (Figura 58). El pico a m/z 281 es consistente con la pérdida de la hexosa, y la pérdida adicional del ácido carboxílico en forma de CO_2 (44 Da) genera

el pico a m/z 237. Este mismo fragmento puede perder una molécula de agua para producir el ion a m/z 219, mientras que el rompimiento β junto a la pérdida de dos moléculas de agua genera el fragmento a m/z 161 (Moco et al., 2007)

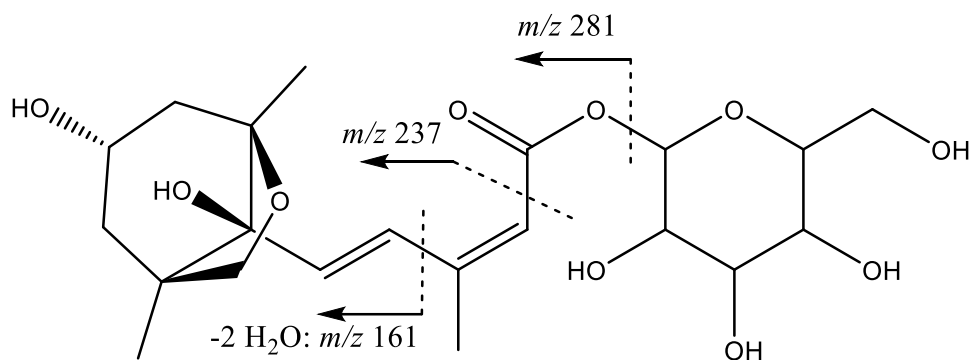


Figura 58. Estructura y fragmentos importantes del ácido dihidrofaseico O-hexósido.

El pico 9 ($t_R = 13.97$ min), $[M-H]^- = 197.0455$ ($C_9H_9O_5$), fue identificado como ácido siríntrico (Figura 59). Este compuesto sufre la pérdida de metilo $[M-H-CH_3]^-$ y una descarboxilación $[M-H-CO_2]^-$ para producir los fragmentos respectivos a m/z 182 y 153 (Barros et al., 2012).

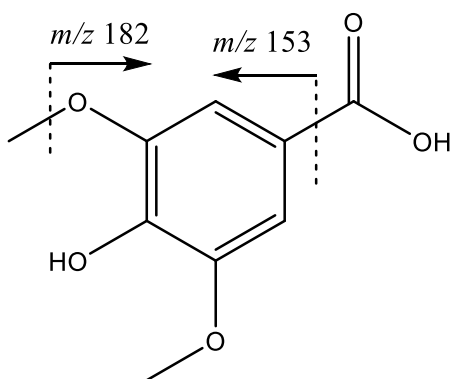
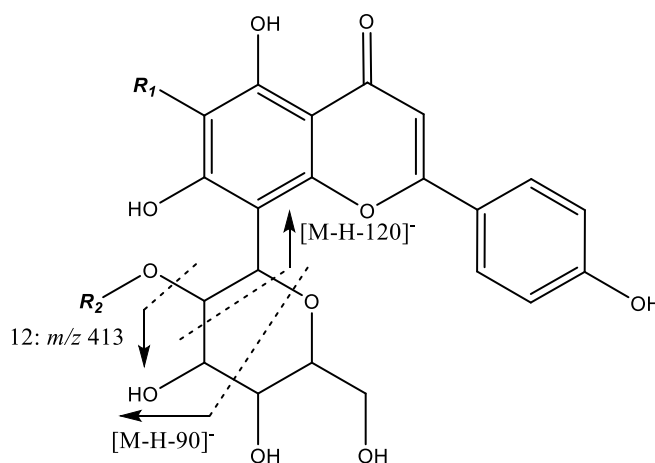


Figura 59. Estructura y fragmentación del ácido siríntrico.

Los picos 10 ($t_R = 14.28$ min) y 11 ($t_R = 15.65$ min) se identificaron como isómeros de la apigenina di-C-hexósido (Figura 60), con su ion pseudo-molecular $[M-H]^-$ respectivo a m/z 593.1492 y m/z 593.1494 ($C_{27}H_{29}O_{15}$). El fragmento principal de ambos picos se observa a m/z 473 $[M-H-120]^-$, correspondiente a la ruptura de uno de los hexósidos. El pico 10 presenta además el fragmento a m/z 503 $[M-H-90]^-$, también derivado del rompimiento del hexósido (Vallverdú-Queralt et al., 2011).

El pico 12 ($t_R = 16.45$ min), $[M-H]^- = 577.1545$ ($C_{27}H_{29}O_{14}$), se identificó como apigenina C-(O-ramnosil)-hexósido. El fragmento principal a m/z 413 es resultado de la pérdida de una O-ramnosa. Posteriormente se forma el ion a m/z 293 por el sucesivo rompimiento de la hexosa generando una pérdida de 120 Da (Figura 60) (Dou et al., 2007).



Compuesto	R_1	R_2
10, 11	-hexosa ($C_6H_{11}O_5$)	-H
12	-H	-ramnosa ($C_6H_{11}O_4$)

Figura 60. Estructura y fragmentación los compuestos C-glicosilados de apigenina.

El pico 13 ($t_R = 18.36$ min) muestra un ion $[M-H]^-$ a m/z 563.1388 ($C_{26}H_{27}O_{14}$), asignado a luteolina O-desoxihexosil-O-pentosa (Figura 61). La pérdida del desoxihexosil genera el fragmento a m/z 417, mientras que si se pierden ambos glicósidos se forma el fragmento a m/z 285 que

corresponde a la aglicona. Complementario a esto, los fragmentos en MS³ a m/z 241, 217, 199, 175 y 151 concuerdan con el patrón de fragmentación de la luteolina (Fathoni et al., 2017).

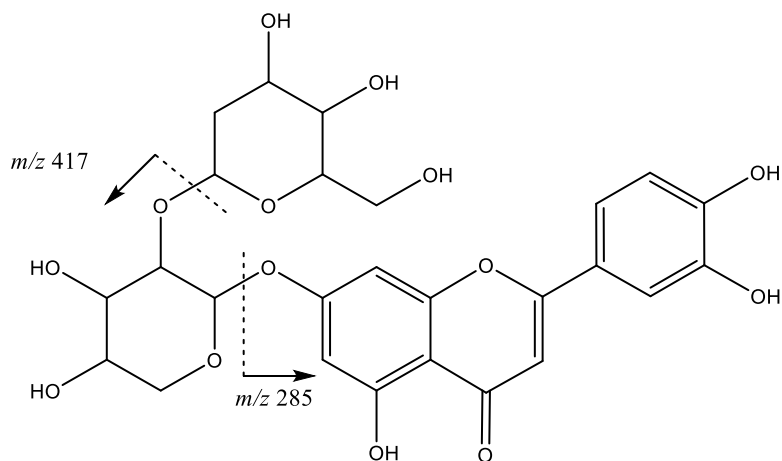


Figura 61. Estructura y fragmentación de la luteolina *O*-desoxihexosil-*O*-pentosa.

Finalmente, el pico 14 ($t_R = 19.72$) se identificó como apigenina *O*-apiosil-desoxihexósido (Figura 62), en base al ion $[M-H]^-$ a m/z 547.1442 ($C_{26}H_{27}O_{13}$) y el único fragmento visible a m/z 269, correspondiente a la aglicona apigenina (Plazonić et al., 2009).

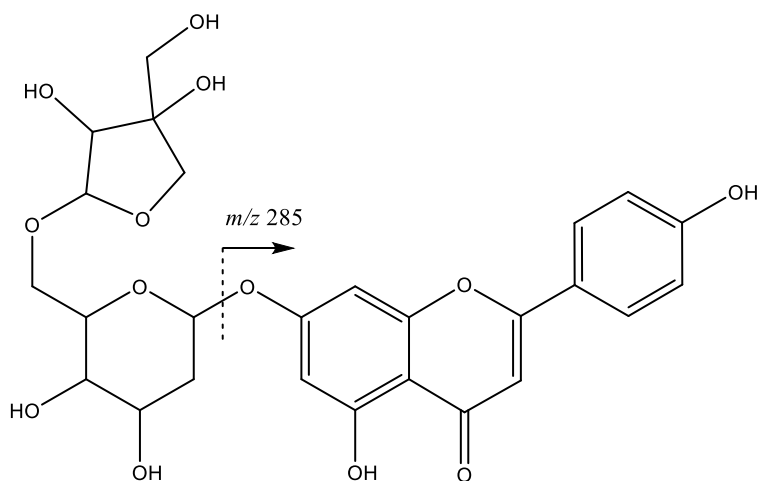


Figura 62. Estructura y fragmentación de la apigenina *O*-apiosil-*O*-desoxihexósido.

4.7 Contenido de polifenoles y actividad antioxidante

Con los extractos polifenólicos de chile y pimienta se realizó la determinación del contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante de estos extractos, como se muestra en las secciones 3.10 a 3.12.

La medición del contenido de fenoles totales y de la capacidad reductora de los extractos de chile y pimienta se realizó con el análisis de Folin-Ciocalteu, el cual es reconocido ampliamente debido a que es un método sencillo y reproducible que se reporta como una forma de cuantificar el contenido polifenólico de una muestra, ya que no discrimina entre los diferentes tipos de polifenoles y simplemente aprovecha la capacidad reductora del grupo fenol, aunque los diferentes tipos de polifenoles también generan respuestas distintas en el ensayo (Platzer et al., 2021).

Los resultados obtenidos para las muestras de chile con este método que se muestran en el Cuadro XXXI en la sección 3.10, corresponden a valores entre 2.9 y 4.4 veces superiores a los reportados en la literatura por Oney-Montalvo et al. (2020), y resultados menores a los obtenidos por de Aguiar et al. (2019); pero se encuentran en un rango similar a los obtenidos por Alvarez-Parrilla et al. (2011), Hamed et al. (2019) y Veličković et al. (2020), como se observa en el Cuadro XLIII.

Cuadro XLIII. Contenido polifenólico total reportado en *Capsicum spp*, analizado mediante el método Folin-Ciocalteu.

Contenido	Unidades	Referencia
861 – 1053	mg AGE/100 g	(de Aguiar et al., 2019)
87 – 149	mg AGE/100 g	(Oney-Montalvo et al., 2020)
600	mg AGE/100 g	(Veličković et al., 2020)
650.5	mg AGE/100 g	(Hamed et al., 2019)
568-1032	mg AGE/100 g	(Alvarez-Parrilla et al., 2011)
1500-2000	mg AGE/100 g	(Meckelmann et al., 2013)
218.2	mg AGE/100 g	(Oboh & Rocha, 2007)

Otras publicaciones en *Capsicum spp*. demuestran la gran variabilidad en este tipo de muestras, con valores que van desde un 50% (Oboh & Rocha, 2007) de la muestra más pobre (Cahpn, 439.0 mg AGE/100 g), hasta un 300% (Meckelmann et al., 2013) del mejor resultado (Cahva, 661 mg GAE/100 g).

Por otro lado, en lo que se refiere a los resultados de la cuantificación de polifenoles totales y capacidad reductora de las muestras de *P. nigrum* costarricenses, son significativamente superiores a los reportes de Gülçin (2005), L. Su et al. (2007) y Zarai et al. (2013) (Cuadro XLIV).

Aún la muestra con el valor más bajo, Pnife (234.7 mg AG/100 g), tiene un resultado que es un 78% superior al mejor valor encontrado por L. Su et al. (2007). Una situación distinta se presenta con Wu et al. (2004), donde es la muestra Pnien la que única que se encuentra dentro del rango reportado, mientras que las muestras Pnife y Pnidi presentan contenidos polifenólicos menores.

Cuadro XLIV. Contenido polifenólico total reportado para *P. nigrum*, analizado mediante el método Folin-Ciocalteu.

Contenido	Unidades	Referencia
0.29 – 0.64	mg AGE/100 g	(Gülçin, 2005)
91 – 132	mg AGE/100 g	(L. Su et al., 2007a)
383 – 711	mg AGE/100 g	(Wu et al., 2004)
0.11 – 4.5	mg AGE/100 g	(Zarai et al., 2013)

La medición de la actividad antioxidante fue realizada asimismo por el método de DPPH, el cual funciona mayoritariamente por un mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET por sus siglas en inglés) que provoca la reducción del compuesto radicalario (Prior et al., 2005).

Los valores antioxidantes obtenidos para las muestras chile que se muestran en la sección 3.11 (Cuadro XXXV) indican el mejor resultado en Cahva (1.05 mg material seco/mL), y la peor actividad antioxidante en Cahpn (2.40 mg material seco/mL), siendo estos resultados significativamente mejores a los publicados por Menichini et al. (2009) y Veličković et al. (2020) (Cuadro XLV). Otro reporte (Santos et al., 2021) muestra por su parte un valor que es solamente un 20% del resultado de Cahva, en una especie distinta de *Capsicum*.

Cuadro XLV. Actividad antioxidante por el método DPPH reportada en *Capsicum spp.*

Contenido	Unidades	Referencia
4.42	IC ₅₀ (mg materia seca/mL)	(Menichini et al., 2009)
4.94	IC ₅₀ (mg materia seca/mL)	(Veličković et al., 2020)
0.21	IC ₅₀ (mg materia seca/mL)	(Santos et al., 2021)

En los extractos polifenólicos de *P. nigrum* se encontró que la actividad antioxidante medida con el método DPPH fue mejor para la muestra Pnidi pues requirió la menor concentración de extracto para obtener el IC₅₀ (44.51 ug/mL) mientras que la muestra Pnife fue

la muestra con un valor IC₅₀ más alto (73.57 ug/mL) y por lo tanto la de menor actividad antioxidante. Al expresar los resultados en función del material seco extraído, el mejor resultado se obtiene con Pnien (1.240 mg/mL), mientras que Pnife sigue siendo la que tiene el peor resultado (3.027 mg/mL).

Los resultados de la muestra Pnien se encuentran dentro del rango reportado por L. Su et al. (2007), y también está cercano al valor obtenido por Khalaf et al. (2008) y al dato superior encontrado por Gülçin (2005). Las otras dos muestras analizadas tienen resultados superiores a los encontrados en la literatura (Cuadro XLVI).

Otras publicaciones presentan valores mejores en este análisis; sin embargo, al utilizar los datos de IC₅₀ en concentración de extracto, los resultados reportados por Nahak & Sahu (2011) (27 µg/mL) y por Zarai et al. (2013) (30 – 75 µg/mL) son cercanos y con un rango semejante al obtenido en este estudio (44.51-73.57 µg/mL, Cuadro XXXVI).

Cuadro XLVI. Actividad antioxidante reportada en *P. nigrum* mediante el método DPPH.

Contenido	Unidades	Referencia
0.60 – 1.15 ^a	IC ₅₀ (mg material seco/mL)	(Gülçin, 2005)
0.41	IC ₅₀ (mg material seco/mL)	(Nahak & Sahu, 2011)
1.57	IC ₅₀ (mg material seco/mL)	(Khalaf et al., 2008)
1.20 – 1.46	IC ₅₀ (mg material seco/mL)	(L. Su et al., 2007a)
0.054 – 0.15 ^a	IC ₅₀ (mg material seco/mL)	(Zarai et al., 2013)

^a Datos aproximados obtenidos de las gráficas y datos mostrados en las respectivas referencias.

El otro análisis con el que se evaluó la capacidad antioxidante de las muestras de chile y pimienta costarricenses es el método ORAC, como se describe en la sección 3.12. La importancia de complementar con este ensayo consiste en la diferencia que implica un proceso de Transferencia de Átomo de Hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés), ya que con este mecanismo se suprimen los radicales mediante la donación de hidrógeno proveniente de un compuesto

donador, para formar una especie radicalaria más estable por la deslocalización de los electrones (Prior et al., 2005).

De esta manera, es posible tener representación de una mayor cantidad de metabolitos en las muestras, ya que, aunque un compuesto tenga actividad antioxidante por un solo mecanismo, de igual forma estará cuantificado en alguno de los análisis realizados.

La evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras Cahfo y Cahva con el método ORAC muestra que se obtienen valores superiores a de Aguiar et al. (2019), mientras que Ortolan et al. (2019) obtiene mejores valores que los del presente estudio (Cuadro XLVII). La muestra Cahpn por su parte es comparable con los resultados de de Aguiar et al. (2019).

Por otro lado, los resultados obtenidos con esta prueba para las muestras de Chile mantienen la tendencia del análisis por DPPH, siendo que en ORAC un valor mayor implica una mejor actividad antioxidante de la muestra.

Cuadro XLVII. Actividad antioxidante reportada para *Capsicum spp* por el método ORAC.

Contenido	Unidades	Referencia
10.4 – 11.5	mmol TE/100 g material seco	(de Aguiar et al., 2019)
55	mmol TE/100 g material seco	(Ortolan et al., 2019)

Para *P. nigrum* (Cuadro XLVIII), la muestra Pnidi se encuentra dentro del rango reportado por Wu et al. (2004), mientras que la muestra Pnife tiene un valor inferior, y la muestra Pnien más bien un resultado mayor, siendo la muestra de pimienta con la mejor actividad antioxidante. El resultado es menor al encontrado por L. Su et al. (2007). Al igual que como sucede con las muestras de *Capsicum spp*, los resultados para *P. nigrum* son consistentes con los obtenidos en DPPH.

Cuadro XLVIII. Actividad antioxidante por el método ORAC reportada en *P. nigrum*.

Contenido	Unidades	Referencia
36.2 – 39.5	mmol TE/100 g material seco	(L. Su et al., 2007a)
12.2 – 16.3	mmol TE/100 g material seco	(Wu et al., 2004)

Finalmente, un análisis de correlaciones de Pearson entre los valores obtenidos para Folin-Ciocalteu, DPPH y ORAC, fueron realizados para todas las muestras (n=6), observándose una correlación significativa positiva entre los valores de Folin-Ciocalteu y ORAC con un $r = 0.923$ ($p < 0.05$) así como correlaciones significativas negativas entre los valores de Folin-Ciocalteu y DPPH con un $r = -0.868$ ($p < 0.05$) y entre los resultados de DPPH y ORAC con un $r = -0.932$ ($p < 0.05$). Estos resultados se alinean con estudios previos que muestran correlación entre los contenidos de polifenoles y evaluaciones antioxidantes (Dudonné et al., 2009; Lizcano et al., 2010).

CONCLUSIONES

En cuanto a la identificación de compuestos en los extractos no polares, el uso de UHPLC-HRMS en los extractos no polares de ambas plantas permitió la identificación de una variedad de compuestos de tipo amida, mostrando una gran utilidad en el análisis de extractos naturales complejos.

Adicionalmente en cuanto a la identificación en estos extractos no polares, se mostró para *P. nigrum* que el perfil de composición obtenido por HPTLC es similar al de muestras de otros países y cumple con los estándares internacionales.

En cuanto a la cuantificación de amidas en *C. annuum*, se logró establecer que estas muestras son similares en contenido a las reportadas en la literatura, aunque también se determinó que la muestra Cahva es la más rica en estos metabolitos.

En cuanto a la cuantificación de amidas en *P. nigrum*, el contenido de piperina en las muestras es comparable a los reportes de la literatura, pero otras amidas como la pellitorina y la guineensina se encontraron en cantidades significativamente superiores, siendo la muestra Pnien la que presenta los mejores valores para todas las amidas cuantificadas.

A partir de ambas especies estudiadas, se logró el aislamiento de algunas de estas amidas. En *C. annuum* destaca la dihidrocapsaicina por su interés como neuroprotector. Mientras que en *P. nigrum* se obtiene piperina, con el rendimiento y pureza adecuados para su aplicación en materiales orgánicos multicomponentes que permitieron la mejora en la solubilidad de dos fármacos y del compuesto natural bioactivo curcumina; pero además se aísla guineensina con un mayor rendimiento que el reportado en la literatura, cuyo interés radica en sus propiedades como inhibidor del sistema endocannabinoide.

Con los extractos polares, ricos en polifenoles, nuevamente la técnica UHPLC-HRMS permitió la identificación de diferentes compuestos en los extractos de *C. annuum* y *P. nigrum*. El contenido polifenólico evaluado por el método Folin-Ciocalteu se encuentra dentro del rango en la literatura para ambas muestras. En cuanto a la evaluación de la actividad antioxidante a

través de los métodos DPPH y ORAC, los resultados que se obtienen muestran correlación con los resultados de contenido polifenólico, coincidiendo con reportes de la literatura.

Este estudio es el primero en Centroamérica que analiza integralmente los metabolitos polares y no polares en ambas plantas, tanto cualitativa como cuantitativamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. a., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *J. Agric. Food Chem.*, *59*(1), 163–173. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>
- Antonious, G. F., Meyer, J. E., & Snyder, J. C. (2006). Toxicity and repellency of hot pepper extracts to spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *J. Environ. Sci. Heal. B.*, *41*(8), 1383–1391. <https://doi.org/10.1080/0360123060096419>
- Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*, *10*(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox10050642>
- Bandyopadhyay, C., Narayan, V. S., & Variyar, P. S. (1990). Phenolics of green pepper berries (*Piper nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, *38*(8), 1696–1699. <https://doi.org/10.1021/jf00098a015>
- Banerji, A., Sarkar, M., Datta, R., Sengupta, P., & Abraham, K. (2002). Amides from *Piper brachystachyum* and *Piper retrofractum*. *Phytochemistry*, *59*(8), 897–901. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00364-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00364-8)
- Barrientos, O., & Chaves, G. (2008). *Región Huetaar Norte. Oferta exportadora acutal y oferta potencial de productos agropecuarios alternativos* (Issue 506). PROCOMER.
- Barros, L., Dueñas, M., Pinela, J., Carvalho, A. M., Buelga, C. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Four Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) Farmers' Varieties in Northeastern Portugal Homegardens. *Plant Foods Hum. Nutr.*, *67*(3), 229–234. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0307-z>
- Basith, S., Cui, M., Hong, S., & Choi, S. (2016). Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain and other diseases. *Molecules*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules21080966>

- Beneito-Cambra, M., Bernabé-Zafón, V., Herrero-Martínez, J. M., & Ramis-Ramos, G. (2009). Study of the fragmentation of D-glucose and alkylmonoglycosides in the presence of sodium ions in an ion-trap mass spectrometer. *Anal. Lett.*, *42*(6), 907–921. <https://doi.org/10.1080/00032710902721956>
- Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food Funct.*, *1*, 73–83. <https://doi.org/10.1039/c0fo00008f>
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, *21*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Brown, P., Brüsweiler, F., Pettit, G. R., & Reichstein, T. (1971). Field ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.*, *5*, 573–597. <https://doi.org/10.1088/0022-3735/7/5/001>
- Cardoso, S. M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J. A., Renard, C. M. G. C., & Coimbra, M. A. (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, *85*(1), 21–32. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1925>
- Castro-Concha, L. A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F. A., & Miranda-Ham, M. L. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *Sci. World J.*, *2014*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/809073>
- Chanthai, S., Juangsamoot, J., Ruangviriyachai, C., & Techawongstien, S. (2012). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some chilli varieties using accelerated solvent extraction associated with solid-phase extraction methods and RP-HPLC-fluorescence. *E-J. Chem.*, *9*(3), 1550–1561. <https://doi.org/10.1155/2012/380574>
- Chapa-Oliver, A. M., & Mejía-Teniente, L. (2016). Capsaicin: From plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*, *21*(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21080931>

- Chatterjee, S., Niaz, Z., Gautam, S., Adhikari, S., Variyar, P. S., & Sharma, A. (2007). Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*). *Food Chem.*, *101*(2), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.008>
- Chithra, S., Jasim, B., Anisha, C., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). LC-MS/MS based identification of piperine production by endophytic *Mycosphaerella* sp. PF13 from *Piper nigrum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, *173*(1), 30–35. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0832-3>
- da Luz, S. F. M., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., de Lemos, O. F., Xavier, L. P., Maia, J. G. S., Ramos, A. de R., Setzer, W. N., & da Silva, J. K. do R. (2017). Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (black pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. piperis. *Int. J. Mol. Sci.*, *18*(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms18122434>
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.*, *52*(1), 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Dawid, C., Henze, A., Frank, O., Glabasnia, A., Rupp, M., Büning, K., Orlikowski, D., Bader, M., & Hofmann, T. (2012). Structural and sensory characterization of key pungent and tingling compounds from black pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, *60*(11), 2884–2895. <https://doi.org/10.1021/jf300036a>
- de Aguiar, A. C., da Fonseca Machado, A. P., Figueiredo Angolini, C. F., de Moraes, D. R., Baseggio, A. M., Eberlin, M. N., Maróstica Junior, M. R., & Martínez, J. (2019). Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *J. Supercrit. Fluids*, *150*, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.016>
- De Araujo, J. X., Da-Cunha, E. V. L., Maria, M. C., & Gray, A. I. (1997). Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, *44*(3), 559–561. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00503-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00503-1)
- Deng, J., & Yang, Y. (2013). Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of

- Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 785, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.056>
- Dou, J., Lee, V. S. Y., Tzen, J. T. C., & Lee, M. R. (2007). Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. *J. Agric. Food Chem.*, 55(18), 7462–7468. <https://doi.org/10.1021/jf0718603>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57(5), 1768–1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Elsadig Karar, M. G., & Kuhnert, N. (2016). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). *J. Chem. Biol. Ther.*, 01(01), 1–23. <https://doi.org/10.4172/2572-0406.1000102>
- Fathoni, A., Saepudin, E., Cahyana, A. H., Rahayu, D. U. C., & Haib, J. (2017). Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado. *AIP Conf. Proc.*, 1862(030079), 1–10. <https://doi.org/10.1063/1.4991183>
- Flores Quisbert, E. N. (2006). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. Universidad de La Laguna.
- FoodB. (2018). *Octadecanamide*. <https://foodb.ca/compounds/FDB012421>. Recuperado el 30 de marzo de 2022.
- FoodB. (2019). *Capsiamide*. <https://foodb.ca/compounds/FDB020783>. Recuperado el 30 de marzo de 2022.
- Foti, M., Daquino, C., & Geraci, C. (2004). Esters with the DPPH • Radical in Alcoholic Solutions. *J. Org. Chem*, 14, 2309–2314.
- Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., Lee, J. S., Ohnisi-Kameyama, M., & Kozukue, N. (2008). Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and

- red whole and ground peppercorns. *J. Agric. Food Chem.*, *56*(9), 3028–3036. <https://doi.org/10.1021/jf703711z>
- Garcés-Claver, A., Arnedo-Andrés, M. S., Abadía, J., Gil-Ortega, R., & Álvarez-Fernández, A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, *54*(25), 9303–9311. <https://doi.org/10.1021/jf0620261>
- Gavilán, R. E., Nebot, C., Veiga-Gómez, M., Roca-Saavedra, P., Vazquez Belda, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2016). A Confirmatory Method Based on HPLC-MS/MS for the Detection and Quantification of Residue of Tetracyclines in Nonmedicated Feed. *J. Anal. Methods Chem.*, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/1202954>
- Geng, P., Sun, J., Zhang, M., Li, X., Harnly, J. M., & Chen, P. (2016). Comprehensive characterization of C-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMSn and mass defect filtering. *J. Mass Spectrom.*, *51*(10), 914–930. <https://doi.org/10.1002/jms.3803>. Comprehensive
- Giraldo Aricapa, A. (2012). *Estudio Fitoquímico De Piper pesaresanum y Piper crassinervium (Piperaceae)* [Universidad Tecnológica de Pereira]. <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/2705/1/5817G516.pdf>
- Gómez-Calvario, V., Gardunõ-Ramírez, M. L., León-Rivera, I., & Rios, M. Y. (2016). ¹H and ¹³C NMR data on natural and synthetic capsaicinoids. *Magn. Reson. Chem.*, *54*(4), 268–290. <https://doi.org/10.1002/mrc.4382>
- Grieman, M. M., Greaves, J., & Saltzman, E. S. (2015). A method for analysis of vanillic acid in polar ice cores. *Clim. Past*, *11*(2), 227–232. <https://doi.org/10.5194/cp-11-227-2015>
- Gülçin, I. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *56*(7), 491–499. <https://doi.org/10.1080/09637480500450248>
- Hamed, M., Kalita, D., Bartolo, M. E., & Jayanty, S. S. (2019). Capsaicinoids, polyphenols and antioxidant activities of *Capsicum annum*: Comparative study of the effect of ripening stage

- and cooking methods. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090364>
- HPTLC Association. (2018). *Piper nigrum - fruit* (pp. 1–3). <https://www.hptlc-association.org/atlas/hptlc-atlas.cfm?atlasCommand=plant&uuid=8W522SQE>. Re
- Huang, X. F., Xue, J. Y., Jiang, A. Q., & Zhu, H. L. (2013). Capsaicin and its analogues: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem.*, 20(21), 2661–2672. <https://doi.org/10.2174/0929867311320210004>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2015). *VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales*. INEC. <http://www.inec.go.cr>
- Jacob, K. D., Hooten, N. N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. E. (2013). Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. *Mech. Ageing. Dev.*, 134(3–4), 139–157. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.02.008>
- Janyou, A., Wicha, P., Jittiwat, J., Suksamrarn, A., Tocharus, C., & Tocharus, J. (2017). Dihydrocapsaicin Attenuates Blood Brain Barrier and Cerebral Damage in Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion via Oxidative Stress and Inflammatory. *Sci. Rep.*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11181-5>
- Jeon, G., Choi, Y., Lee, S.-M., Kim, Y., Oh, M., Jeong, H.-S., & Lee, J. (2012). Antioxidant and Antiproliferative Properties of Hot Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Seeds. *J. Food Biochem.*, 36(5), 595–603. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00571.x>
- Jeong, W. Y., Jin, J. S., Cho, Y. A., Lee, J. H., Park, S., Jeong, S. W., Kim, Y. H., Lim, C. S., Abd El-Aty, A. M., Kim, G. S., Lee, S. J., Shim, J. H., & Shin, S. C. (2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *J. Sep. Sci.*, 34(21), 2967–2974. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100524>
- Jia, W., Wang, C., Wang, Y., Pan, G., Jiang, M., Li, Z., & Zhu, Y. (2015). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medical preparation lianhua-qingwen capsule by UPLC-DAD-QTOF-MS. *Sci. World J.*, 2015, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2015/731765>

- Katarina, S., Darinka, A. G., Aleksandar, C., Tatjana, R., Bojana, V., & Mustafa, A. (2019). Piperine: Old Spice and New Nutraceutical? *Curr. Pharm. Des.*, *25*(15), 1729–1739. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190701150803>
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K., & Yamane, Y. (2004). Screening for Antioxidant Activity in Edible Plant Products: Comparison of Low-Density Lipoprotein Oxidation Assay, DPPH Radical Scavenging Assay, and Folin-Ciocalteu Assay. *J. Agric. Food Chem.*, *52*(8), 2391–2396. <https://doi.org/10.1021/jf035372g>
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turk. J. Biol.*, *32*(1), 51–55.
- Kikuzaki, H., Kawabata, M., Ishida, E., Akazawa, Y., Takei, Y., & Nakatani, N. (1993). LC-MS Analysis and Structural Determination of New Amides from Japanese Long Pepper (*Piper retrofractum*). *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, *57*(8), 1329–1333. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1329>
- Koch, W. (2019). Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. *Nutrients*, *11*(5), 1–35. <https://doi.org/10.3390/nu11051039>
- Lee, S. W., Kim, M. S., Park, M. H., Park, S. J., Lee, W. S., Chang, J. S., & Rho, M. C. (2010). Alkamides from *Piper longum* and *Piper nigrum* as inhibitors of IL-6 action. *Bull. Korean Chem. Soc.*, *31*(4), 921–924. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.04.921>
- Leri, M., Scuto, M., Ontario, M. L., Calabrese, V., Calabrese, E. J., Bucciantini, M., & Stefani, M. (2020). Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, *21*, 1–40. <https://doi.org/10.3390/ijms21041250>
- Li, K., Fan, Y., Wang, H., Fu, Q., Jin, Y., & Liang, X. (2015). Qualitative and quantitative analysis of an alkaloid fraction from *Piper longum* L. using ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *109*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.012>
- Li, K., Zhu, W., Fu, Q., Ke, Y., Jin, Y., & Liang, X. (2013). Purification of amide alkaloids from *Piper*

- longum* L. using preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography. *Analyst*, 138(11), 3313–3320. <https://doi.org/10.1039/c3an00016h>
- Li, N., Liu, J. H., Zhang, J., & Yu, B. Y. (2008). Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 56(10), 3876–3883. <https://doi.org/10.1021/jf073520n>
- Li, Sen, Lei, Y., Jia, Y., Li, N., Wink, M., & Ma, Y. (2011). Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 19(1), 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.031>
- Li, Sensen, Lin, Z., Jiang, H., Tong, L., Wang, H., & Chen, S. (2016). Rapid Identification and Assignment of the Active Ingredients in Fufang Banbianlian Injection Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. *J. Chromatogr. Sci.*, 54(7), 1225–1237. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw055>
- Liu, H. L., Luo, R., Chen, X. Q., Ba, Y. Y., Zheng, L., Guo, W. W., & Wu, X. (2015). Identification and simultaneous quantification of five alkaloids in *Piper longum* L. by HPLC-ESI-MSⁿ and UFLC-ESI-MS/MS and their application to *Piper nigrum* L. *Food Chem.*, 177, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.033>
- Lizcano, L. J., Bakkali, F., Begoña Ruiz-Larrea, M., & Ignacio Ruiz-Sanz, J. (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem.*, 119(4), 1566–1570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.043>
- Maliszewska, J., & Tęgowska, E. (2012). Capsaicin as an Organophosphate Synergist Against Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa Decemlineata* Say). *J. Plant Prot. Res.*, 52(1), 28–34. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0005-8>
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A., & Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 827(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.023>

- Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Di Donna, L., Maiuolo, L., Napoli, A., & Sindona, G. (2012). Assay of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by tandem mass spectrometry and isotope dilution method. *Food Chem.*, *135*(3), 1006–1010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.005>
- McRae, T. G., Gregson, R. P., & Quinn, R. J. (1982). Amberlite XAD-7 as a Chromatographic Absorbent. *J. Chromat. Sci.*, *20*, 475–478.
- Meckelmann, S. W., Riegel, D. W., Van Zonneveld, M. J., Ríos, L., Peña, K., Ugas, R., Quinonez, L., Mueller-Seitz, E., & Petz, M. (2013). Compositional characterization of native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.). *J. Agric. Food Chem.*, *61*(10), 2530–2537. <https://doi.org/10.1021/jf304986q>
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J., & Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chem.*, *114*(2), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.086>
- Merck KGaA. (2022). *Guineensine*. <https://www.sigmaaldrich.com/CR/es/product/sigma/smb01002>. Recuperado el 27 de junio de 2022.
- Moco, S., Capanoglu, E., Tikunov, Y., Bino, R. J., Boyacioglu, D., Hall, R. D., Vervoort, J., & De Vos, R. C. H. (2007). Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, *58*(15–16), 4131–4146. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm271>
- Molina-Torres, J., García-Chávez, A., & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.*, *64*(3), 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00134-2)
- Munigunti, R., Nelson, N., Mulabagal, V., Gupta, M. P., Brun, R., & Calderón, A. I. (2011). Identification of oleamide in *Gutteria recurvisepala* by LC/MS-based *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase ligand binding method. *Planta Med.*, *77*(15), 1749–1753.

<https://doi.org/10.1055/s-0030-1271080>

Nahak, G., & Sahu, R. K. (2011). Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *J. Appl. Pharm. Sci.*, *1*(8), 153–157.

National Institutes of Health (NIH). (2022). *Dietary Supplement Label Database*. <https://dsld.od.nih.gov/api-guide>. Recuperado el 2 de febrero de 2022.

Nicolussi, S., Viveros-Paredes, J. M., Gachet, M. S., Rau, M., Flores-Soto, M. E., Blunder, M., & Gertsch, J. (2014). Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol. Res.*, *80*, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.12.010>

Niki, E. (2011). Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? *J. Berry Res.*, *1*(4), 169–176. <https://doi.org/10.3233/JBR-2011-018>

Oboh, G., & Rocha, J. B. T. (2007). Polyphenols in red pepper [*Capsicum annuum* var. *aviculare* (Tepin)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver. *Eur. Food Res. Technol.*, *225*(2), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0410-1>

Okwute, S. K., & Egharevba, H. O. (2013). Piperine-Type Amides: Review of the Chemical and Biological Characteristics. *Int. J. Chem.*, *5*(3), 99–122. <https://doi.org/10.5539/ijc.v5n3p99>

Oney-Montalvo, J. E., Avilés-Betanzos, K. A., Jesús Ramírez-Rivera, E. De, Ramírez-Sucre, M. O., & Rodríguez-Buenl, I. M. (2020). Polyphenols content in capsicum chinense fruits at different harvest times and their correlation with the antioxidant activity. *Plants*, *9*(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants9101394>

Ortolan, S. A., Hermes, V. C., Pedroso, P. S., Leal, V. L., Tischer, B., Possuelo, L. G., & Da Silva, C. D. M. (2019). Determinação da atividade antioxidante das matrizes vegetais *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Tripodanthus acutifolius*. *Revista Jovens Pesquisadores*, *9*(2), 98–105. <https://doi.org/10.17058/rjp.v9i2.13419>

Park, I. K., Lee, S. G., Shin, S. C., Park, J. D., & Ahn, Y. J. (2002). Larvicidal activity of isobutylamides

- identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J. Agric. Food Chem.*, *50*(7), 1866–1870. <https://doi.org/10.1021/jf011457a>
- Pignatelli, P., Menichelli, D., Pastori, D., & Violi, F. (2018). Oxidative stress and cardiovascular disease: New insights. *Kardiol. Pol.*, *76*(4), 713–722. <https://doi.org/10.5603/KP.a2018.0071>
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). How does the phenol structure influence the results of the folin-ciocalteu assay? *Antioxidants*, *10*(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox10050811>
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Željko, Mornar, A., Nigović, B., & Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, *14*, 2466–2490. <https://doi.org/10.3390/molecules14072466>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, *53*(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- PROCOMER. (2015a). *Consumidores demandan nuevas mezclas y sabores en salsas picantes*. <http://www.procomer.com/es/noticias/consumidores-demandan-nuevas-mezclas-y-sabores-en-salsas-picantes>
- PROCOMER. (2015b). *Pimienta producida en Zona Norte se venderá en México*. <http://www.procomer.com/en/noticias/pimienta-producida-en-zona-norte-se-vender-en-mexico>
- PROCOMER. (2018). *Costa Rica expone diversidad de su oferta exportable en Expocomer Panamá*. <https://www.procomer.com/noticia/costa-rica-expone-diversidad-de-su-oferta-exportable-en-expocomer-panama/>
- PROCOMER. (2019). *Productos agrícolas de Costa Rica exponen su diversidad y frescura en Fruitlogistica Alemania*. *Productos agrícolas de Costa Rica exponen su diversidad y frescura en Fruitlogistica Alemania*. <https://www.procomer.com/noticia/productos-agricolas-de->

costa-rica-exponen-su-diversidad-y-frescura-en-fruitlogistica-alemania/

- PROCOMER. (2021). *Empresas lideradas por mujeres participaron de misión comercial virtual con compradores de Europa*. <https://www.procomer.com/noticia/comprador-internacional-noticia/empresas-lideradas-por-mujeres-participaron-de-mision-comercial-virtual-con-compradores-de-europa/>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed.*, *50*(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Ramesh, B., Sarma, V. U. M., Kumar, K., Babu, K. S., & Devi, P. S. (2015a). Simultaneous determination of six marker compounds in *Piper nigrum* L. and species comparison study using high-performance thin-layer chromatography-mass spectrometry. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, *28*(4), 280–286. <https://doi.org/10.1556/1006.2015.28.4.3>
- Ramesh, B., Sarma, V. U. M., Kumar, K., Babu, K. S., & Devi, P. S. (2015b). Simultaneous determination of six marker compounds in *Piper nigrum* L. and species comparison study using high-performance thin-layer chromatography-mass spectrometry. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, *28*(4), 280–286. <https://doi.org/10.1556/1006.2015.28.4.3>
- Rao, V. R. S., Raju, S. S., Sarma, V. U., Sabine, F., Babu, K. H., Babu, K. S., & Rao, J. M. (2011). Simultaneous determination of bioactive compounds in *Piper nigrum* L. and a species comparison study using HPLC-PDA. *Natural Product Research*, *25*(13), 1288–1294. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.535158>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, *26*(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.*, *49*(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Rosas, J., Martínez, J. O., Alonso, P., Miranda, R., Velasco, L., Rubio-Pérez, L., & Pérez, F. J. (2019).

- Alternative mass spectrometry techniques for the validation of the fragmentation pattern of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 33(7), 635–640. <https://doi.org/10.1002/rcm.8388>
- Sabinsa Corporation. (n.d.). *Black Pepper Extract – A Natural Bioavailability Enhancer*. <https://bioperine.com/aboutbioperine/black-pepper-extract/> Recuperado el 31 de enero de 2022.
- Said, R. Ben, Hamed, A. I., Mahalel, U. A., Al-Ayed, A. S., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Oleszek, W., & Stochmal, A. (2017). Tentative characterization of polyphenolic compounds in the male flowers of *Phoenix dactylifera* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and DFT. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030512>
- Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdonmez, E., Valussi, M., Tumer, T. B., Fidalgo, L. M., Martorell, M., & Setzer, W. N. (2019). *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*, 24, 1–117. <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- Santos, L. S., Fernandes, C. C., Santos, L. S., de DEUS, I. P. B., de SOUSA, T. L., & Miranda, M. L. D. (2021). Ethanolic extract from *Capsicum chinense* jacq. Ripe fruits: Phenolic compounds, antioxidant activity and development of biodegradable films. *Food Sci. Technol. (Brazil)*, 41(2), 497–504. <https://doi.org/10.1590/fst.08220>
- Scheau, C., Badarau, I. A., Caruntu, C., Mihai, G. L., Didilescu, A. C., Constantin, C., & Neagu, M. (2019). Capsaicin: Effects on the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Molecules*, 24(13), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24132350>
- Schweiggert, U., Carle, R., & Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 557(1–2), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.032>

- Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R., & Arnason, J. T. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem. Rev.*, 7(1), 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Scott, I. M., Puniani, E., Jensen, H., Livesey, J. F., Poveda, L., Sánchez-Vindas, P., Durst, T., & Arnason, J. T. (2005). Analysis of piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 1907–1913. <https://doi.org/10.1021/jf048305a>
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53(20), 7749–7759. <https://doi.org/10.1021/jf051513y>
- Shi, Y. N., Liu, F. F., Jacob, M. R., Li, X. C., Zhu, H. T., Wang, D., Cheng, R. R., Yang, C. R., Xu, M., & Zhang, Y. J. (2017). Antifungal Amide Alkaloids from the Aerial Parts of *Piper flaviflorum* and *Piper sarmentosum*. *Planta Medica*, 83(1–2), 143–150. <https://doi.org/10.1055/s-0042-109778>
- Shingate, P. N., Dongre, P. P., & Kannur, D. M. (2013). New Method Development for Extraction and Isolation of Piperine From Black Pepper. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 4(8), 3165. <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4>
- Silva, D. B., Turatti, I. C. C., Gouveia, D. R., Ernst, M., Teixeira, S. P., & Lopes, N. P. (2014). Mass Spectrometry of flavonoid vicenin-2, based sunlight barriers in *Lychnophora* species. *Sci. Rep.*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep04309>
- Slinkard, K., & Singleton, V. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28(1), 49–55. <http://www.ajevonline.org/content/28/1/49.short>
- Smith, B. T., Majid, F., Eckl, V., & Reynolds, C. M. (2021). Herbal Supplement Sales in US Increase by Record-Breaking 17.3% in 2020. Sales of immune health, stress relief, and heart health supplements grow during COVID-19. pandemic. *HerbalGram*, 131, 52–65.

<http://herbalgram.org/media/16783/hg131-hmr.pdf>

Su, H. C. F. (1977). Insecticidal Properties of Black Pepper to Rice Weevils and Cowpea Weevils. *J. Econ. Entomol.*, 70(1), 18–21.

Su, H. C. F., & Horvat, R. (1981). Isolation, Identification, and Insecticidal Properties of. *J. Agric. Food Chem.*, 29(1), 115–118.

Su, L., Yin, J. J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., & Yu, L. (Lucy). (2007a). Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem.*, 100(3), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.058>

Su, L., Yin, J. J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., & Yu, L. (Lucy). (2007b). Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem.*, 100(3), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.058>

The Observatory of Economic Complexity (OEC). (2021). *Pepper*. <https://oec.world/en/profile/hs/pepper> Recuperado el 2 de febrero de 2022.

Thomas, B. V., Schreiber, A. A., Weisskopf, C. P., & Weisskopf, C. P. (1998). Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 46(7), 2655–2663. <https://doi.org/10.1021/jf970695w>

Tomás-Barberán, F. A., Blázquez, M. A., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1992). A Comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochem. Anal.*, 3, 178–181. <https://doi.org/10.1002/pca.2800030407>

Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M., & Moreno, J. J. (2018). Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.*, 156, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.050>

Tridge. (2022a). *Dried Whole Chili Pepper*. <https://www.tridge.com/es/intelligences/other-chili-pepper/export> Recuperado el 22 de junio de 2022.

- Tridge. (2022b). *Whole Black Peppercorn*. <https://www.tridge.com/es/intelligences/black-pepper/export> Recuperado el 2 de febrero de 2022.
- Turrini, E., Sestili, P., & Fimognari, C. (2020). Overview of the Anticancer Potential of the “King of Spices” Piper nigrum and Its Main Constituent Piperine. *Toxins*, *12*, 1–33. <https://doi.org/10.3390/toxins12120747>
- USP-NF. (2015). *Dietary Supplement Monographs, Powdered Black Pepper*. (pp. 1–2). https://doi.org/https://doi.org/10.31003/USPNF_M7085_01_01
- Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Di Lecce, G., Andrés-Lacueva, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (2011). Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF). *Food Chem.*, *129*(3), 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.038>
- Veličković, D., Virijević, M., Stanojević, L., Stanojević, J., Mošić, I., Golubović, S., Perić, S., & Stamenković, G. (2020). Capsaicin, phenols and flavonoids quantification in Leskovac and Habanero hot peppers. *Adv. Technol.*, *9*(1), 21–26. <https://doi.org/10.5937/savteh2001021v>
- Vippagunta, S. R., Wang, Z., Hornung, S., & Krill, S. L. (2007). Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *J. Pharm. Sci.*, *96*(2), 294–304. <https://doi.org/10.1002/jps.20754>
- Wei, K., Li, W., Koike, K., Pei, Y., Chen, Y., & Nikaido, T. (2004). New amide alkaloids from the roots of Piper nigrum. *J. Nat. Prod.*, *67*(6), 1005–1009. <https://doi.org/10.1021/np030475e>
- Wilhelm-Romero, K., Quirós-Fallas, M. I., Vega-Baudrit, J. R., Guillén-Girón, T., Vargas-Huertas, F., Navarro-Hoyos, M., & Araya-Sibaja, A. M. (2022). Evaluation of Piperine as Natural Coformer for Eutectics Preparation of Drugs Used in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, *23*(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02270-4>
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, *52*(12), 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>

- Yoon, M., Jung, J., Kim, M., Lee, C., Cho, S., & Um, M. (2022). Effect of Black Pepper (*Piper nigrum*) Extract on Caffeine-Induced Sleep Disruption and Excitation in Mice. *Nutrients*, *14*, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu14112249>
- Zahra, N., Kalim, I., Hina, S., Javed, A., Manzar Inam, S., Muhammad Malik, S., & Arshad, F. (2016). Estimation of capsaicin in different chilli varieties using different Extraction Techniques and HPLC method: A Review. *Pak. J. Food Sci.*, *26*(1), 2226–5899.
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Ben Salem, N., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT--Food Sci. Technol.*, *50*(2), 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.036>
- Zaugg, J., Baburin, I., Strommer, B., Kim, H. J., Hering, S., & Hamburger, M. (2010). HPLC-based activity profiling: discovery of piperine as a positive GABA_A receptor modulator targeting a benzodiazepine-independent binding site. *J. Nat. Prod.*, *73*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1021/np900656g>