

## Cuantificación de Capsaicinoides en *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker (*Solanaceae*) y en Especialidades Farmacéuticas

Gustavo O. SEIN<sup>1</sup>, Claudia A. GARDINALI<sup>1</sup>, Eloy L. MANDRILE<sup>1\*</sup>  
y Lázaro F. R. CAFFERATA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Especialidad Farmacognosia, Area Biología Vegetal y Productos Naturales,  
Departamento de Ciencias Biológicas y

<sup>2</sup> Laboratorio LADECOR, División Química Orgánica, Departamento de Química,  
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,  
Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.

---

**RESUMEN.** Se ha efectuado la cuantificación de capsaicinoides en la oleorresina de cápsico utilizando técnicas relativas como espectrofotometría UV y HPLC, realizándose un análisis crítico de la metodología analítica aplicada. Las determinaciones se efectuaron sobre la oleorresina obtenida directamente de una especie autóctona, *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker, así como sobre oleorresinas ya incorporadas en formas farmacéuticas. Las técnicas empleadas resultan accesibles a cualquier laboratorio convencional de análisis farmacéuticos y pueden ser aplicadas al estudio de oleorresinas provenientes de diferentes especies.

**SUMMARY.** "Quantitation of capsaicinoids in *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker (*Solanaceae*) and in pharmaceutical dosage forms". Quantitation of capsaicinoids in *Capsicum* oleoresin has been performed by relative techniques as UV spectrophotometry and HPLC. The determinations were done on the oleoresin obtained from a local species, *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker, as well as on oleoresins included in pharmaceutical dosage forms. The techniques employed are accesible to conventional laboratories of pharmaceutical analysis and can be used to the study of oleoresins coming from different species.

---

### INTRODUCCION

Como analgésico de uso tópico, los capsaicinoides han adquirido rápida difusión en la terapéutica actual. Tresh es quien aísla en 1846 por cristalización los principios pungentes del cápsico y propone entonces el nombre de capsaicina<sup>1</sup>. Los primeros estudios estructurales sobre capsaicina fueron realizados por Micko<sup>2</sup>, pero la estructura molecular fue elucidada por Nelson y Dawson<sup>3-4</sup>, al ser posible la identificación de los productos de su hidrólisis. La primera síntesis total de capsaicina fue realizada por Spath y Darling<sup>5</sup>, confirmando el trabajo realizado por los autores que la aislaron inicialmente.

En la monografía de esta droga (*Capsicum annum* var. *minimum* (Miller) Heisery, *Capsicum frutescens* L., *Solanaceae*) en el *British Pharmaceutical Codex* (1968) se describen los constituyentes químicos, los caracteres macro y microscó-

**PALABRAS CLAVE:** Capsaicina, Capsaicinoides, *Capsicum chacoense*.

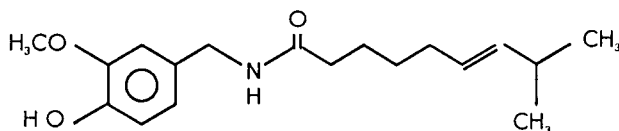
**KEY WORDS:** Capsaicin, Capsaicinoids, *Capsicum chacoense*.

\* Autor a quien se debe enviar la correspondencia: E-mail: mandrile@biol.unlp.edu.ar

picos, los adulterantes más comunes y los sustituyentes, así como sus preparaciones farmacéuticas (ungüentos, oleorresina y tinturas).

La extracción con disolventes volátiles apropiados permite obtener la oleorresina de cápsico, líquido denso de color rojo oscuro, de olor atenuado y sumamente irritante, en el que se diferencian una fracción volátil (esencia) y otra fija (resina) <sup>6</sup>.

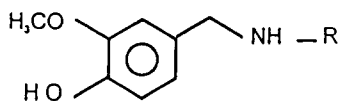
El análisis de la mayoría de las oleorresinas por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa ha permitido caracterizar más de cien componentes diferentes <sup>7</sup>. En esta compleja y heterogénea composición química se encuentran incluidos los capsaicinoides y en particular capsaicina, el principio activo más abundante (Figura 1).



**Figura 1.** Capsaicina

El contenido de capsaicinoides en especies de *Capsicum* varía generalmente de 0,1 a 1 % y en algunos casos se registran valores de hasta 1,5 %.

El grupo de alcaloides con nitrógeno extranuclear aislados del *Capsicum* representa una familia de productos naturales llamados capsaicinoides <sup>8</sup>. La cromatografía gaseosa asociada a la espectrometría de masa ha revelado la presencia de cinco compuestos importantes : capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y homocapsaicina <sup>9</sup> (Figura 2).



$R = -CO - (CH_2)_6 - CH(CH_3)_2$	Dihidrocapsaicina
$R = -CO - (CH_2)_7 - CH(CH_3)_2$	Homodihidrocapsaicina
$R = -CO - (CH_2)_5 - CH(CH_3)_2$	Nordihidrocapsaicina
$R = -CO - (CH_2)_5 - CH = CH(CH_3)_2$	Homocapsaicina

**Figura 2.** Capsaicinoides

Capsaicina (CAS 404-86-4), N[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil (E) 6-nonenamida, tiene dos isómeros geométricos, pero sólo el trans se encuentra en la naturaleza; el isómero cis se denomina Civamida (CAS 25775-090).

El compuesto erróneamente llamado "capsaicina sintética", en realidad ha generado una confusión sustancial tanto en la literatura química como en la biológica. Este compuesto se denomina N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-nonanamida y es conocido como la vainillilamida del ácido pelargónico, siendo oficialmente nombrada como nonivamida (Figura 3). Nonivamida difiere de capsaicina en dos importantes elementos estructurales: el doble enlace en la molécula de capsaicina

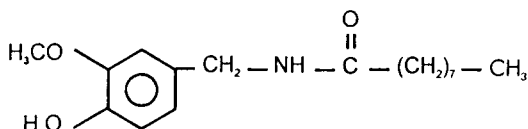


Figura 3. Nonivamida

ha sido reducido y el grupo metilo de la cadena hidrocarbonada removido; sin embargo la parte amídica de la molécula es idéntica. Estos compuestos pueden distinguirse fácilmente por sus espectros de masa, IR y RMN.

Nonivamida resulta ser un adulterante económico de capsaicina y también puede sustituir la oleoresina de cápsico en sus aplicaciones, particularmente en bromatología. No obstante la "capsaicina sintética" no es reconocida por la nomenclatura farmacéutica, ni por la literatura científica y se debe evitar el empleo de tal terminología. Por ello, la FDA (Food and Drug Administration, USA) reconoce únicamente a capsaicina como entidad química del cápsico.

En el presente trabajo se ha procedido a la cuantificación de capsaicinoides en la oleoresina del cápsico, tanto en la oleoresina obtenida de una especie autóctona (*Capsicum chacoense* A.T. Hunziker) así como la ya incorporada a una forma farmacéutica (crema), expresándose el resultado como equivalente en capsaicina y describiéndose en cada caso la metodología que ha sido utilizada.

## MATERIAL Y METODOS

### Cuantificación de capsaicinoides en *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker

**Preparación de la muestra.** Se trabajó con frutos maduros de *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker obtenidos de plantas indígenas procedentes de la provincia de Jujuy (Parque Nacional Calilegua). Varias muestras (frutos cortados en cintas) fueron secadas en estufa a 40 °C, realizándose una molienda fina y finalmente fueron sometidas a una extracción con cloroformo por calentamiento a reflujo hasta agotamiento.

**Purificación de los extractos.** El extractivo obtenido se purificó por TLC, utilizándose silica gel G como soporte y éter-etílico como fase móvil. Se realizaron siembras de 20 µl de las muestras y del estándar (capsaicina de un 97 % de pureza, solución 10<sup>-3</sup> M en metanol); se desarrolló la cromatoplaca, determinándose un Rf de 0,78 correspondiente a los capsaicinoides presentes. Las referencias se revelaron con DCC (dicloro-quinon clorimida) y los capsaicinoides fueron detectados por la leve fluorescencia que emiten a 254 nm.

**Cuantificación.** Se realizaron determinaciones espectrofotométricas en un instrumento marca Metrolab modelo 1700 con celdas de 1 cm de camino óptico, retomándose con metanol la fracción correspondiente a capsaicinoides y procediéndose a la lectura entre 280-282 nm. Para la cuantificación se realizaron las respectivas curvas de calibración utilizando capsaicina estándar en medio metanólico (97% de pureza). En la Figura 4 se presenta uno de los espectros típicos correspondientes a los extractivos purificados.

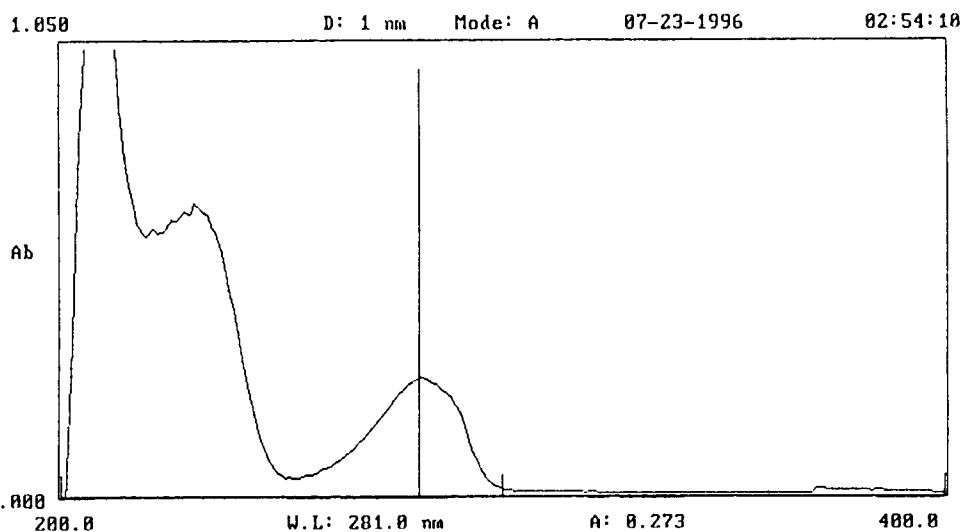


Figura 4. Espectro U.V. de los extractos purificados.

### **Cuantificación de capsaicinoides en formas farmacéuticas**

**Preparación de la muestra.** La cuantificación de capsaicinoides se realizó en especialidades medicinales que se dispensan habitualmente bajo la forma de cremas; en las mismas se declara que contienen oleoresina de cápsico, con un equivalente de capsaicina igual a 25 mg/100 g de crema. Las muestras fueron tratadas utilizando metanol y alcohol isopropílico como disolventes, optándose finalmente por metanol en base a los estudios cinéticos realizados previamente.<sup>10</sup> Para la disolución de las muestras se utilizó un baño de ultrasonido, efectuándose una posterior filtración.

**Separación y cuantificación.** La técnica instrumental seleccionada para el análisis fue la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), utilizándose un cromatógrafo marca Hewlett-Packard modelo 1090 con arreglo de diodos. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: columna Lichrocart Superspher 100 RP C18 (125 mm x 4 mm, 4  $\mu$ m de tamaño de partícula), fase móvil acetonitrilo-agua (50:50 v/v), temperatura de columna 45 °C, detección 282 nm, caudal 1 ml/min, inyección 10  $\mu$ l. En la Figura 5 se pueden observar los cromatogramas típicos correspondientes a las muestras y a las referencias de capsaicina sintética en metanol (97% de pureza) utilizadas.

## **RESULTADOS**

### **Metodología Analítica ( HPLC)**

Con el fin de determinar la confiabilidad de los resultados se analizaron los siguientes aspectos de la técnica analítica: selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud y robustez.

Se han podido identificar los productos de descomposición de capsaicina en medio acuoso a diferentes pH, utilizando cromatografía gaseosa asociada a espectrometría de masa <sup>10</sup>. Es de destacar que productos tales como hidrocarburos de

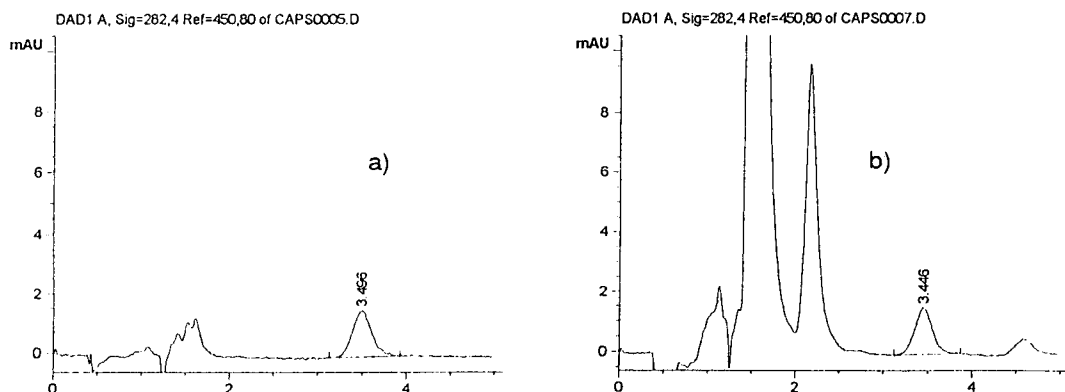


Figura 5. Cromatogramas. a) De las referencias. b) De las muestras.

alto peso molecular, algunos ésteres y vainillina no interfieren con la técnica de cuantificación de capsaicinoides utilizada en este trabajo.

El rango lineal en que se trabajó fue de 4 a 30 µg/ml. Por medio del test de Student se realiza un análisis estadístico donde se obtuvo una correlación lineal mejor que  $p: 0.05$ . Del análisis de la pendiente de la recta correspondiente al estudio de linealidad ( $y = 5389,9x - 873,27$ ) se deduce una buena sensibilidad del método.

La precisión de la metodología analítica se estudió tanto sobre el sistema como sobre el método. Se inyectaron 6 preparaciones de estándar y 6 preparaciones de muestra final, obteniéndose un coeficiente de variación (CV) de 0,9% y 1,2%, respectivamente.

Para comprobar la exactitud del método empleado se trabajó sobre un placebo de la crema con los componentes habituales, al cual se le había incorporado capsaicina sintética. Se emplearon tres concentraciones del analito, preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema, por encima y por debajo del valor medio. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

% INCORPORADO	% HALLADO			% RECUPERADO		
83,3	80,1	79,5	81,2	96,1	95,4	97,48
102,2	103,3	99,8	103,0	101,1	97,7	100,8
118,0	117,1	115,3	115,8	99,2	97,7	98,1

La recuperación media fue de 98,2% con un coeficiente de variación de 1,94% en los datos analizados. Por medio del test de Student se corroboró la no existencia de diferencias significativas entre la media y el 100%. Sin embargo, no se han determinado los límites de detección y de cuantificación; sólo se puede señalar que hasta 4 µg/ml se ha trabajado con exactitud y precisión apropiadas.

En cuanto a la robustez del método se puede mencionar que pequeños cambios en las variables analíticas utilizadas (caudal, temperatura de columna, inyección, composición de la fase móvil, intervalo entre preparación de muestra e inyección) no produjeron alteración significativa de los resultados obtenidos.

### **Cuantificación de capsaicinoides en *Capsicum chacoense* A.T. Hunziker**

El contenido medio de capsaicinoides que surge del análisis de la oleorresina obtenida a partir de frutos de *Capsicum chacoense* es de un 0,3%, expresado como capsaicina. Se utilizaron para las medidas tres extractivos provenientes de muestras recolectadas en diferentes épocas. El análisis de cada extractivo se realizó en la forma ya mencionada. Los valores obtenidos para cada muestra fueron los siguientes 0,12%, 0,32% y 0,39% de capsaicinoides expresados como capsaicina.

### **Cuantificación de capsaicinoides en formas farmacéuticas**

El contenido medio de capsaicinoides (expresado como capsaicina) fue de 25,39 mg /100 g de crema, con una dispersión en las medidas de 1,1% (CV), aproximadamente un año después de haber sido elaborada la misma y conservada en condiciones de estante.

El intervalo de confianza determinado es (25,1 : 25,7) mg / 100gr de crema. Seis datos fueron utilizados (24,97 / 25,54 / 25,63 / 25,19 / 25,3 / 25,71), se calculó mediante Student, donde el nivel de significación empleado fue de p: 0,05, correspondiente a un intervalo de confianza del 95%.

### **CONCLUSIONES**

El contenido medio de capsaicinoides determinado en la oleorresina de *Capsicum chacoense* se encuentra dentro de la variabilidad de resultados encontrados para otras especies. La dispersión de los valores individuales observada puede atribuirse principalmente a las diferentes épocas del año en que fueron recolectadas las muestras.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de la forma farmacéutica se puede concluir que la misma cumple con lo declarado.

Paralelamente se han propuesto metodologías de trabajo para la cuantificación de capsaicinoides de la oleorresina de cápsico que pueden ser extendidas a las oleorresinas provenientes de diferentes especies. Estas metodologías analíticas son accesibles para un laboratorio convencional de análisis farmacéutico, pudiéndose aplicar convenientemente y con éxito en cada caso, según se trate de análisis de materias primas o de productos terminados.

El desarrollo de técnicas que permitan separar capsaicina y sus homólogos sería un aspecto importante de abordar en un futuro estudio de estos compuestos sobre oleorresinas provenientes de diferentes especies.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Thresh, L.T. (1846) *Pharm. J.* **6**: 941-2
2. Micko, L. (1898) *Z. Unters Nabr Genussm Gebrauchgegenstaende* **1**: 818
3. Nelson, E.K. (1919) *J. Am. Chem. Soc.* **41**: 1115-21
4. Nelson, E.K. & L.E. Dawson (1923) *J. Am. Chem. Soc.* **45**: 2179-81
5. Spath, E. & S.F. Darling (1930) *Chem. Ber.* **63B**: 737-43
6. Osol, A. & G.E. Farrar (1950) *The Dispensatory of the United States of America*, págs. 213-16
7. Keller, U., R.A. Flath, R.A. Mon & R. Teranischi (1981) ACS Symposium Series Nº 170. American Chemical Society, Washington DC, pág. 137
8. Kosuge, S., Y. Inagaki & H. Okumura (1961) (C.A. 60: 8827g) *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **35**: 923
9. Masada, Y., K.Hashimoto & M. Suzuki (1971) *J. Food Sci.* **36**: 858-60
10. Sein, G., E.L. Mandrile & L.F.R. Cafferata (1997) *Boll. Chim. Farmaceutico* **136**: 239-45