

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 807**

21 Número de solicitud: 201700713

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

12.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.03.2019

Fecha de concesión:

23.09.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.09.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación. Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

**MONAGO MARAÑA, Olga;
GALEANO DIAZ, Teresa y
MUÑOZ DE LA PEÑA CASTRILLO, Arsenio**

54 Título: **Método de determinación del índice de pungencia en una muestra**

57 Resumen:

Método de determinación del índice de pungencia en una muestra mediante extracción de los analitos desde las muestras, obtener las señales fluorimétricas de las muestras (obtención de las matrices de excitación — emisión) y aplicar un algoritmo quimiométrico que permite determinar la concentración de capsaicinoides para expresarlo posteriormente en las unidades correspondientes del índice de pungencia (índice de Scoville).

ES 2 703 807 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Método de determinación del índice de pungencia en una muestra.

- 5 La presente invención se refiere a un método para medir el índice de pungencia en una muestra, mediante fluorescencia total y el análisis de los datos obtenidos.

Antecedentes de la invención

- 10 La pungencia del género capsicum se debe a un grupo de compuestos denominados capsaicinoides, los cuales están compuestos por una amina ácida de vanillilamina unida a cadenas de ácidos grasos de longitud C₉-C₁₁.

- 15 El método convencional empleado para este fin fue el desarrollado en 1912 por W. Scoville, que determinaba la pungencia en lo que se conoce como unidades Scoville. Este método es un método organoléptico el cual ha sido sometido a muchas críticas dado la subjetividad del mismo, ya que cada consumidor percibe el picor de una manera diferente. Por ello, posteriormente en 1977 Todd y colaboradores (P.H. Todd J.R., Journal of Food Science, 1977, 42 (3), 660 - 665) establecieron los valores de pungencia de los diferentes capsaicinoides puros que permiten establecer la relación entre concentración de capsaicinoides (µg/g) y las unidades de Scoville.

- 20 Se han desarrollado una multitud de métodos para la determinación de capsaicinoides en diferentes muestras de alimentos picantes (pimientos, chiles, pimentón, salsas...). No obstante, prácticamente todas emplean técnicas separativas. Estas técnicas requieren de tiempos de análisis generalmente largos, del empleo de una instrumentación cara, de una fase móvil compuesta por disolventes orgánicos, y, como consecuencia, de un consumo elevado de disolventes orgánicos, que además de su coste, suponen una mayor contaminación al medioambiente.

- 25 Existen solicitudes de patentes que describen otras formas de determinar la pungencia como son las siguientes:

- 30 La solicitud estadounidense con número de publicación US201410014534 describe un método de detección electroquímico de capsaicinoides. La solicitud estadounidense con número de publicación US20110218739 describe un aparato para medir la pungencia del polvo de pimiento rojo, que incluye: una unidad de medición de infrarrojo cercano.

- 35 Ninguna de estas solicitudes de patentes describe el empleo de fluorescencia total para la determinación de este parámetro.

Descripción de la invención

- 40 La presente invención describe un método de determinación del índice de pungencia en una muestra mediante fluorescencia total y análisis matemático de los datos obtenidos que supone una mejora en cuanto a lo descrito anteriormente, ya que se trata de un procedimiento más rápido, menos costoso y más respetuoso con el medio ambiente.

- 45 En el método descrito en la presente invención se trata de extraer los analitos responsables del carácter pungente, capsaicinoides y aprovechar sus propiedades fluorescentes que, en combinación con el empleo del análisis matemático, permite llevar a cabo una determinación de este parámetro sin necesidad de disponer de un equipo cromatográfico. Se lleva a cabo el análisis en un menor tiempo, con una instrumentación más asequible económicamente y un

menor consumo de disolventes, lo cual redonda también en un ahorro, siendo un método más respetuoso con el medio ambiente.

El método presenta buena precisión y reproducibilidad.

5 Por lo tanto un primer aspecto de la invención se refiere a un método de determinación del índice de pungencia en una muestra que comprende las etapas de:

- 10 a) extracción de los capsaicinoides de la muestra;
- b) medición mediante fluorescencia total de los capsaicinoides extraídos en la etapa a) y registro de los datos de fluorescencia total de los capsaicinoides;
- 15 c) análisis de los datos obtenidos en la etapa de b).

El término fluorescencia total se refiere a la fluorescencia molecular con matrices de excitación-emisión.

20 Descripción detallada de la invención

Como se ha dicho un primer aspecto de la invención se refiere a un método de determinación del índice de pungencia en una muestra que comprende las etapas de:

- 25 a) extracción de los capsaicinoides de la muestra;
- b) medición mediante fluorescencia total de los capsaicinoides extraídos en la etapa a) y registro de los datos de fluorescencia total de los capsaicinoides;
- 30 c) análisis de los datos obtenidos en la etapa de b).

En el método descrito la muestra es preferentemente una muestra alimentaria o una muestra farmacéutica. De manera particular la muestra alimentaria es pimentón o una salsa.

35 En el método descrito los capsaicinoides son preferentemente: capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. De manera particular los capsaicinoides son capsaicina y dihidrocapsaicina.

40 En una realización preferente la etapa de extracción es una etapa de extracción en fase sólida. Más preferentemente la etapa de extracción en fase sólida presenta las subetapas de: preparación de la muestra, retención de la muestra en una columna, elución de los componentes no deseables, elución de los capsaicinoides. Aún más preferentemente la etapa de preparación de la muestra comprende a su vez las etapas de: pesar la muestra, añadir un volumen de un disolvente de extracción a la muestra en un baño de ultrasonidos, centrifugar dicho volumen y evaporar el sobrenadante.

45 El disolvente de extracción elegido debe tener unas características generalmente poco polares, ya que estos analitos no presentan una polaridad elevada. Por ello, el disolvente de extracción se selecciona de manera preferente entre: metanol, acetonitrilo o una mezcla de ambos. De manera particular se selecciona metanol. El volumen de extracción se selecciona en proporción al sólido. De manera general entre 1:50 y 1: 250 (p/v). De manera particular 1:100 (p/v). El tiempo de extracción en ultrasonidos se selecciona en función de obtener la mayor señal fluorimétrica posible. De manera preferente se seleccionará entre 3 y 15 min. De manera particular se selecciona 10 min. Se centrifuga la muestra de manera preferente entre 3-10 min.

50

De manera particular 5 min. De manera particular se evapora a sequedad el sobrenadante en un rotavapor.

5 De manera preferente tras evaporar el sobrenadante, se reconstruye el residuo evaporado con un disolvente de reconstrucción. De manera preferente dicho disolvente es una mezcla de metanol: agua. De manera más preferente es una mezcla 10:90 (v/v) - 40:60 (v/v). De manera particular 30:70 (v/v).

10 Se lleva a cabo una extracción en fase sólida. Preferentemente dicha extracción en fase sólida se lleva a cabo en un cartucho en fase inversa; de manera preferente C8 o C18; de manera particular C18.

15 De manera preferente la etapa de elución de los componentes no deseables se realiza con una mezcla de metanol: agua 40:60 (v/v) - metanol: agua 60:40 (v/v). De manera preferente metanol: agua 60:40 (v/v). El volumen a pasar será de manera preferente entre 2 y 6 mL. De manera particular 4 mL.

20 En cuanto a la elución de los capsaicinoides se lleva a cabo con una mezcla metanol: agua. De manera preferente una mezcla metanol: agua 70:30 (v/v) - metanol: agua 90:10 (v/v). De manera particular una mezcla metanol: agua 80:20 (v/v).

De manera preferente el extracto de capsaicinoides se diluye con metanol o acetonitrilo. De manera particular con acetonitrilo.

25 De manera preferente la etapa b) se realiza a un rango de longitudes de onda de excitación comprendido en un rango entre 200 nm y 350 nm y un rango de longitudes de emisión en un rango entre 250 y 600 nm. De manera particular, la excitación se registrará entre 210 - 300 nm y la emisión entre 280 - 400 nm.

30 De manera preferente el análisis de datos obtenidos en la etapa b) se lleva a cabo mediante un tratamiento matemático de las señales con algoritmos quimiométricos de segundo orden y se lleva a cabo la cuantificación del contenido total de capsaicinoides; en particular análisis paralelo de factores o mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización residual. De manera particular, análisis paralelo de factores.

35

Ejemplos

Ejemplo 1

40 Se pesan 0.2 g de pimentón y se añaden 20 mL de metanol. Se extrae durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos y se centrifuga durante 5 min. El sobrenadante se evapora a sequedad y se reconstituye en 15 mL de una mezcla metanol: agua 30:70 (v/v). A continuación se lleva a cabo una extracción en fase sólida empleando un cartucho C18. Para ello, se pasan 5 mL de muestra, seguidos de 4 mL de una mezcla metanol: agua 40:60 (v/v) y, finalmente 4 mL de una
45 mezcla metanol: agua 80:20 (v/v). Se toma una alícuota de 0.2 mL de este extracto y se diluye a 3 mL con acetonitrilo. Se registra la fluorescencia total (fluorescencia molecular con matrices de excitación - emisión) fijando el rango de longitud de onda de excitación entre 210 y 300 nm y el de emisión entre 260 y 400 nm. Se lleva a cabo el tratamiento de las señales obtenidas mediante el algoritmo de segundo orden análisis paralelo de factores y se obtiene la
50 concentración de capsaicinoides, expresada en unidades Scoville, es decir, el índice de pungencia del pimentón. Este resultado es comparado con aquel obtenido mediante un análisis cromatográfico y se comprueba que la combinación de esta extracción de la muestra, con la obtención de su señal espectrofluorimétrica y el tratamiento de la misma mediante un algoritmo

matemático supone un método alternativo para la determinación del índice de pungencia del pimentón.

Los resultados fueron los siguientes:

5

Unidades Scoville según el método utilizado en el Ejemplo 1: 12349;

Unidades Scoville según análisis cromatográfico: 12188.

10 Ejemplo 2

Se pesan 1.0 g de salsa y se añaden metanol: agua 30:70 (v/v) hasta un volumen fijo de 10 mL. Se centrifuga durante 5 min. A continuación se lleva a cabo una extracción en fase sólida empleando un cartucho C18. Para ello, se pasan 5 mL de muestra, seguidos de 4 mL de una mezcla metanol: agua 40:60 (v/v) y, finalmente 4 mL de una mezcla metanol: agua 80:20 (v/v). Se toma una alícuota de 0.5 mL de este extracto y se diluye a 3 mL con acetonitrilo. Se registra la fluorescencia total (fluorescencia molecular con matrices de excitación - emisión) fijando el rango de longitud de onda de excitación entre 210 y 300 nm y el de emisión entre 260 y 400 nm. Se lleva a cabo el tratamiento de las señales obtenidas mediante el algoritmo de segundo orden análisis paralelo de factores y se obtiene la concentración de capsaicinoides, expresada en unidades Scoville, es decir, el índice de pungencia del pimentón. Este resultado es comparado con aquel obtenido mediante un análisis cromatográfico y se comprueba que existe una buena correlación entre ambos.

25 Los resultados fueron los siguientes:

Unidades Scoville según el método utilizado en el Ejemplo 2: 1336;

Unidades Scoville según análisis cromatográfico: 1385.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de determinación del índice de pungencia en una muestra caracterizado porque comprende las etapas de:
- a) extracción de los capsaicinoides de la muestra;
- 10 b) medición mediante fluorescencia total de los capsaicinoides extraídos en la etapa a) y registro de los datos de fluorescencia total de los capsaicinoides;
- c) análisis de los datos obtenidos en la etapa de b).
- 15 2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la muestra es una muestra alimentaria.
3. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la muestra es una muestra farmacéutica.
- 20 4. Método según la reivindicación 2 donde la muestra alimentaria es pimentón.
5. Método según la reivindicación 2 donde la muestra alimentaria es una salsa.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque los capsaicinoides son capsaicina y dihidrocapsaicina.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque la etapa de extracción es una etapa de extracción en fase sólida.
- 30 8. Método según la reivindicación 7 caracterizado porque la etapa de extracción en fase sólida presenta las subetapas de: preparación de la muestra, retención de la muestra en una columna, elución de los componentes no deseables, elución de los capsaicinoides.
- 35 9. Método de determinación según la reivindicación 8 caracterizado porque la subetapa de preparación de la muestra comprende a su vez las etapas de: pesar la muestra, añadir un volumen de un disolvente de extracción a la muestra en un baño de ultrasonidos, centrifugar dicho volumen y evaporar el sobrenadante.
- 40 10. Método de determinación según la reivindicación 9 caracterizado porque tras evaporar el sobrenadante, se reconstruye el residuo evaporado con un disolvente de reconstrucción.
11. Método de determinación según las reivindicaciones 1-10 caracterizado porque la etapa b) se realiza a un rango de longitudes de onda de excitación comprendido en un rango entre 200nm y 350 nm y un rango de longitudes de emisión en un rango entre 250 y 600 nm.
- 45 12. Método de determinación según las reivindicaciones 1-11 caracterizado porque la etapa c) se lleva a cabo mediante análisis paralelo de factores.