



Escuela Politécnica
Superior - Huesca



Universidad
Zaragoza

Proyecto Fin de Carrera

INGENIERO AGRÓNOMO

Identificación de metabolitos relacionados con el carácter picante en variedades españolas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de “Reconocida Calidad Diferenciada” (Denominaciones de Origen Protegidas e Indicaciones Geográficas Protegidas).

Autor:

Alberto Galán Enciso

Directores:

Ana Garcés-Claver

Oreto Fayos Avellán

Escuela Politécnica Superior de Huesca

Abril 2014

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ana Garcés y Oreto Fayos su dedicación en las diferentes etapas dentro de la elaboración de este proyecto. Igualmente al resto de miembros del CITA, que en algún momento u otro me han servido de gran ayuda.

También quiero reseñar en estas líneas el apoyo constante e incondicional recibido por mi familia en todo momento.

Por último, no querría olvidarme de los diferentes compañeros y amigos que me han acompañado durante este trayecto.

A todos ellos, MUCHAS GRACIAS.

Índice de tablas	i
Índice de figuras	iii
Lista de abreviaturas	v
Resumen	vii
Abstract	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación taxonómica	1
1.2 Origen y domesticación	2
1.3 Producción de pimiento	3
1.4 Usos del pimiento	6
1.5 Denominaciones de origen e importancia	7
1.6 El carácter picante en pimiento: los capsicinoides	12
1.7 Métodos de determinación y cuantificación de los capsicinoides	14
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1 Material vegetal	19
3.2 Reactivos y soluciones	21
3.3 Extracción de capsicinoides	22
3.4 Método analítico HPLC-ESI-MS	22
3.5 Análisis estadístico	23
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Identificación de capsicinoides mayoritarios y minoritarios mediante HPLC-ESI-MS/MS(QTOF).	25
4.2 Análisis cualitativo de la composición de capsicinoides	30
4.3 Análisis cuantitativo del contenido de capsicinoides	36
5 CONCLUSIONES	41
6 BIBLIOGRAFÍA	43
 Anexo 1 Tiempo de Retención (RT), relación masa-carga exacta de $[M+H]^+$ (m/z), fórmula elemental y error de los capsicinoides biosintetizados en un fruto de distintas variedades de pimiento comercial con reconocida calidad diferenciada.....	 47

Índice de tablas

Tabla 1: Producción mundial de hortalizas en el año 2013	3
Tabla 2: Superficie y producción de los principales países productores de pimiento (2013).	4
Tabla 3: Superficie y producción europea de pimiento (2013).....	4
Tabla 4: Producción y superficie de pimiento en España para el año 2013	5
Tabla 5: Producción, comercialización y valor económico de las diferentes DOP e IGP de hortalizas destinadas a la industria conservera.....	8
Tabla 6: Estructuras químicas, fórmula empírica, peso molecular y relación masa-carga (m/z) de los capsicinoides clasificados en función de la posición del metil en la cadena acil (anteiso, iso o lineal). (1) 4-ene-6-metil nornorcapsicina; (2) N-vainillin 5-octenamida; (3) 6-metil nornordihidrocapsicina; (4) N-vainillin octanamida; (5) 4-ene-7-metil norcapsicina; (6) N-vainillin 6-nonenamida; (7) 6-metil nordihidrocapsicina; (8) 7-metil nordihidrocapsicina; (9) N-vainillin nonanamida; (10) 6-ene-8-metil capsicina [capsicina]; (11) 8-metil dihidrocapsicina [dihidrocapsicina]; (12) N-vainillin decanamida; (13) 6-ene-8-metil homocapsicina; (14) 6-ene-9-metil homocapsicina; (15) N-vainillin 8-undecenamida; (16) 8-metil homodihidrocapsicina; (17) 9-metil homodihidrocapsicina; (18) N-vainillin undecanamida.....	14
Tabla 7: Tipo de Reconocida Calidad Diferenciada, variedad de pimiento e información disponible del picor de los frutos analizados.	19
Tabla 8. Tiempo de Retención (RT), relación masa-carga exacta de $[M+H^+]$ (m/z), fórmula elemental y error de los capsicinoides biosintetizados en un fruto de la variedad Berezi en estado maduro. Los números entre paréntesis hacen referencia a los compuestos de la Tabla 6 y la Figura 8	28
Tabla 9: Perfil de capsicinoides de los distintos frutos de pimiento analizados. (1) 4-ene-6-metil nornorcapsicina, (3) 6-metil nornordihidrocapsicina; (4) N-vainillin octanamida; (5) 4-ene-7-metil norcapsicina; (6) N-vainillin 6-nonenamida; (7) 6-metil nordihidrocapsicina; (8) 7-metil nordihidrocapsicina; (9) N-vainillin nonanamida; (10) 6-ene-8-metil capsicina (capsicina); (11) 8-metil dihidrocapsicina (dihidrocapsicina); (12) N-vainillin decanamida; (13) 6-ene-8-metil homocapsicina; (14) 6-ene-9-metil homocapsicina; (15) N-vainillin 8-undecenamida; (16) 8-metil homodihidrocapsicina; (17) 9-metil homodihidrocapsicina y (18) N-vainillin undecanamida. 1 = Presencia, 0 = Ausencia.....	34
Tabla 10: Cuadrados medios para los valores transformados de CAP y DHC de los distintos extractos de frutos analizados.	38
Tabla 11: Agrupación de medias para los datos transformados $[\log(x+1)]$ de concentración de CAP y de DHC	39

Índice de figuras

Figura 1: Distribución de especies de <i>Capsicum</i> domesticadas en la época del descubrimiento de América.	2
Figura 2: Crema de uso tópico cuyo principio activo es la capsaicina.	6
Figura 3: Corte longitudinal de un fruto de pimiento.	12
Figura 4: Ruta de biosíntesis propuesta para los capsicinoides	13
Figura 5: Distribución geográfica de las variedades de pimiento utilizadas.....	20
Figura 6: Variedades suministradas por las diferentes asociaciones o empresas adscritas con una figura de calidad diferenciada.....	21
Figura 7. Patrón de fragmentación MS/MS característico de la capsaicina (m/z 306)	26
Figura 8: Cromatograma de la variedad Berezi (estado maduro).....	29
Figura 9: Dendrograma de la similitud de todas las entradas de pimiento analizadas en función de la presencia o ausencia de los distintos capsicinoides detectados	33
Figura 10: Gráfica de concentraciones de capsaicina y dihidrocapsicina.....	37

Lista de abreviaturas

a.C.: antes de Cristo

ANOVA: Analysis of variance (análisis de la varianza)

CAP: capsicina

CS: Capsicina sintasa

DMBMO: 4,5-dimetoxibenzil-4-metiloctamide

DHC: dihidrocapsicina

DOP: Denominación de Origen Protegida

EE.UU.: Estados Unidos de América

ES: error estándar

ESI: Ionización por electrospray

ETG: Especialidad Tradicional Garantizada

g.l.: grados de libertad

HPLC-MS: High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas)

HPLC-ESI-MS/MS(QTOF): Cromatografía líquida de alta resolución con fuente de ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas en tandem y con analizador cuadrupolo de tiempo de vuelo

IGP: Indicación Geográfica Protegida

L.: Carl von Linneo

log: logaritmo

m/z : relación masa - carga

ms: materia seca

MS/MS: Espectrometría de masas en tandem

n.d.: no detectado

P: probabilidad

PVDF: polifluoruro de vinilideno

R^2 : Correlación múltiple al cuadrado

SI: estándar interno

UPGMA: Unweighted pair group method with arithmetic mean (método de agrupamiento por pares con media aritmética)

UV: ultravioleta visible

Willd: Carl Ludwig Willdenow

Resumen

Una de las principales características del pimiento (*Capsicum annuum* L.) es su carácter picante, derivado de la presencia de unos metabolitos secundarios conocidos como capsicinoides. Estos compuestos únicamente se sintetizan y acumulan frutos del género *Capsicum*. Los dos capsicinoides mayoritarios son la capsicina y la dihidrocapsicina, pero existen más capsicinoides minoritarios que participan en el nivel de picante. Un mejor conocimiento del perfil de estos metabolitos secundarios en las diferentes variedades resultará de interés tanto a la industria agroalimentaria como a la farmacéutica.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) se considera una herramienta útil para la detección e identificación de capsicinoides ya que permite una óptima separación y detección de estos compuestos. Por otro lado, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) identifica los capsicinoides según su patrón específico de fragmentación, característica clave para la identificación de estos compuestos minoritarios, que a menudo resulta complicada porque suelen aparecer en menor proporción y coeluyendo.

El objetivo de este trabajo Final de Carrera ha sido la identificación de capsicinoides en distintas variedades de pimiento españolas con calidad diferenciada (Denominación de Origen Protegida e Indicación Geográfica Protegida), mediante un método de HPLC-ESI-MS/MS y el análisis de los distintos perfiles de capsicinoides en estas variedades de pimiento.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la variabilidad del contenido de capsicina y dihidrocapsicina, así como del perfil de capsicinoides para cada variedad de pimiento.

Abstract

One of the main characteristics of pepper (*Capsicum annuum* L.) is its spicy character, based on the presence of some secondary metabolites known as capsaicinoids. These compounds are synthesized and accumulate only fruits of the genus *Capsicum*. The two major capsaicinoids and capsaicin are dihydrocapsaicin, but there are more minority capsaicinoids involved in the level of spiciness. A better understanding of the profile of these secondary metabolites in the different varieties is of interest to both the food industry and pharmaceuticals.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC -MS) is considered a useful tool for the detection and identification of capsaicinoids. It allows optimal separation and detection of these compounds. Moreover, the tandem mass spectrometry (MS / MS) identifies the capsaicinoid by fragmentation pattern specific key to the identification of these minor compounds, which feature often complicated because they often appear in a lower proportion and coelution.

The aim of this work final race has been the identification of capsaicinoids in different varieties of pepper with differentiated quality Spanish (Protected Designation of Origin and Protected Geographical Indication) by HPLC-ESI-MS/MS method and analysis of the different profiles of capsaicinoids in these pepper varieties.

The results obtained show the variability of the content of capsaicin and dihydrocapsaicin and capsaicinoid profile for each origin denomination of pepper.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación taxonómica

Las distintas variedades de pimiento se encuentran incluidas dentro del género *Capsicum*. El nombre del género deriva del griego, según unos autores de *kapso* (picar), según otros de *kapsake* (cápsula) (Nuez et al., 1996). La compleja taxonomía se debe a la gran variabilidad de formas en las distintas especies y a la diversidad de criterios empleados para su clasificación (Hunziker, 1950; Hunziker, 1998; Heiser y Smith, 1953; Eshbaug, 1979; y Pickersgill et al., 1979). La taxonomía del género es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Spermatophyta*

Subdivisión: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Metachlamideae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Género: *Capsicum*

El género *Capsicum* contiene alrededor de 30 especies, siendo cinco de ellas las más cultivadas:

- *C. annuum* L. var *annuum*, conforma la mayor parte de las variedades cultivadas. Se caracteriza por poseer las corolas de color blanquecino y las flores solitarias.
- *C. baccatum* L. var *pendulum* (Willd.) Eshbaugh. La corola es blanca, teniendo en su interior zonas amarillentas. Las flores aparecen solitarias.
- *C. chinense* Jacq., contiene 3-5 flores por nudo, siendo la corola de color púrpura.
- *C. frutescens* L., corola verde-clara o amarillo-clara, pudiendo aparecer las flores solitarias o en pares en cada nudo.
- *C. pubescens* Ruiz-Pavón. Posee la corola color púrpura siendo las flores solitarias.

1.2 Origen y domesticación

Las distintas especies del género *Capsicum* son originarias de Sudamérica (Pickersgill, 1969; McLeod et al., 1982; Eshbaugh et al., 1983; Walsh y Hoot, 2001; Pickersgill, 1984; Eshbaugh, 1993). En tres zonas americanas se han identificado secuencias arqueológicas: El Valle de Tehuacán, el Valle de Oaxaca y la Sierra de Tamaulipas. Son zonas semiáridas situadas en México con fluctuaciones estacionales que afectan la variedad de recursos de subsistencia durante el año. Las zonas áridas favorecen tanto la conservación de materiales arqueológicos como los restos botánicos.

La domesticación de las diferentes especies de pimiento ocurrió entre los años 5200 y 3400 a. C. (Andrews, 1984), realizándose independientemente en varias áreas y empleando diferentes especies silvestres. La combinación de evidencias arqueológicas, análisis genéticos y la distribución actual de las plantas, ha permitido a los investigadores sugerir que *C. annuum* fue inicialmente domesticado en México o en el norte de América Central, *C. frutescens* en el Caribe, *C. baccatum* en Bolivia, *C. chinense* en el norte de la Amazonía, y *C. pubescens* en el sur de los Andes (Pickersgill, 1984; Eshbaugh, 1993) (Figura 1).

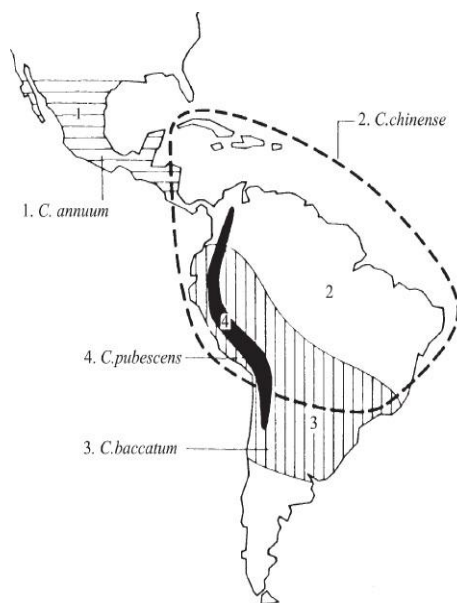


Figura 1: Distribución de especies de *Capsicum* domesticadas en la época del descubrimiento de América.

El pimiento fue traído a Europa en el primero de los viajes de Colón desde América, llegando a la Península Ibérica, desde donde rápidamente se difundió al resto de Europa y del Mundo. En el siglo XVI el pimiento aparece ampliamente difundido por Europa, también

durante este mismo siglo se inició su expansión tanto en el Extremo Oriente como en África (Pénzes, 1967).

1.3 Producción de pimiento

El pimiento es la novena hortaliza más producida en el mundo con alrededor de 30 millones de toneladas (t) (Tabla 1) (FAOSTAT, 2013). China es el principal país productor (15 millones de t) y España ocupa la sexta posición con aproximadamente 1×10^6 t (Tabla 2).

Tabla 1: Producción mundial de hortalizas en el año 2013

Hortaliza	Producción *10 ⁶ (t)
Tomate	159,5
Sandía	102,8
Cebolla	86,3
Col y otras crucíferas	68,6
Pepino, pepinillo	64,7
Berenjena	46,8
Zanahoria y nabo	35,8
Melón	31,2
Chiles, Pimiento picantes, pimientos (verdes)	29,6

En relación a la superficie de cultivo/rendimiento (Tabla 2), se muestra diferencia entre países con una alta tasa de rendimiento (Países Bajos) con respecto a otros (Indonesia), debido a las diferencias en las innovaciones de cultivo entre ambos países. Pese a que en Países Bajos se consiguen rendimientos cinco veces superiores a los obtenidos en España, debido al elevado grado de mecanización de los cultivos, España ocupa la segunda posición en cuanto a rendimiento (superior a 50 t/ha) muy influenciada por la gran cantidad de producción obtenida bajo plástico, con una producción de 920.000 t, se consolida como el sexto productor mundial.

Tabla 2: Superficie y producción de los principales países productores de pimienta (2013).

<i>País</i>	<i>Superficie (ha)</i>	<i>Producción 10⁶ (t)</i>	<i>Rendimiento (t/ha)</i>
China	707.086	15.5	21,9
México	144.391	2.1	14,8
Turquía	93.826	1.9	21,0
Indonesia	239.770	1.5	6,2
EE.UU.	30.110	0,99	32,9
España	17.739	0,92	51,9
Egipto	39.666	0,67	16,9
Nigeria	57.382	0,45	7,8
Argelia	21.272	0,38	18,0
Países Bajos	1.357	0,37	269
Total Mundial	1.837.703	29,60	16,1

A nivel europeo, España es el mayor productor (Tabla 3), abarcando casi un tercio de toda la producción europea. Los siguientes países en producción son Países Bajos y Rumania. España es el primer exportador europeo, seguido de Países Bajos y Turquía. Con una exportación total de 564.254 t (FEPEX, 2013), Alemania es el principal destinatario de los productos (186.168 t), seguido de Francia (97.222 t), Países Bajos (57.013 t) e Italia (54.597 t).

Tabla 3: Superficie y producción europea de pimienta (2013)

<i>País</i>	<i>Superficie (ha)</i>	<i>Producción (t)</i>	<i>Rendimiento (t/ha)</i>
España	17.739	921.089	51,9
Países Bajos	1.357	365.000	269,0
Rumania	20.001	253.505	12,7
Italia	10.327	229.093	22,2
Ucrania	17.100	185.200	10,8
Macedonia	8.465	153.842	18,2
Serbia	17.888	145.206	8,1
Grecia	3.600	130.800	36,3
Hungría	2.668	128.003	48,0

Bulgaria	4.620	66.298	14,4
Total Europa	118.584	2.857.593	24,1

A nivel nacional, la superficie y producción de pimiento, se ha reducido desde el año 2007 en un 20% y un 15% respectivamente (MAGRAMA, 2013). La producción asciende a 918.549 t, para una superficie total de 17.595 ha, siendo 6.984 ha al aire libre (40%) y 10.367 ha como cultivo protegido (60%). La exportación asciende a 511.340 t, lo que supone un 56% de la producción total. Andalucía es la principal Comunidad Autónoma productora de este cultivo y Almería la provincia en la que se focaliza la mayor parte de la producción (Tabla 4).

Tabla 4: Producción y superficie de pimiento en España para el año 2013

	Superficie (ha)				Rendimiento (kg/ha)			
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		Producción (t)
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
GALICIA	36	601	700	1.337	9.056	57.198	50.796	70.259
ASTURIAS	13	2	3	18	10.000	20.000	30.000	260
PAÍS VASCO	115	134	50	229	9.924	17.343	29.004	49.015
NAVARRA	-	770	6	776	-	25.647	21.350	19.876
LA RIOJA	-	169	3	172	-	25.000	42.000	4.351
ARAGÓN	-	177	1	178	-	13.685	27.000	2.449
CATALUÑA	1	383	12	396	804	22.718	42.582	9.213
BALEARES	-	59	28	87	-	24.100	40.200	2.548
CASTILLA Y LEÓN	2	271	9	282	5.000	20.224	74.622	6.162
MADRID	-	30	-	30	-	25.000	-	750
C. LA-MANCHA	-	1.203	35	1.238	-	37.676	35.400	46.563
C. VALENCIANA	3	153	498	654	10.000	18.411	71.691	38.549
MURCIA	-	146	1.188	1.334	-	44.000	88.000	110.968
EXTREMADURA	-	458	13	471	-	34.891	250.000	19.230
ANDALUCÍA	57	2.361	7.730	10.148	8.395	31.752	64.266	572.218
ALMERÍA	-	60	7.240	7.300	-	23.350	64.760	470.263
CANARIAS	7	67	91	165	10.000	44.546	77.185	10.078
ESPAÑA	244	6.984	10.367	17.595	9.617	32.644	66.386	918.549

1.4 Usos del pimiento

El principal uso al que se destina el pimiento está relacionado con el arte culinario, ya sea para consumo en fresco, especia o colorante. A continuación se citan algunos de los ejemplos más empleados en la cocina mundial actual: i) la salsa tabasco tiene su origen en el chile tabasco (*C. frutescens*) el cual fue introducido en Louisiana (EE.UU.) procedente del estado de Tabasco (México) para ser el comienzo de la conocida salsa (Pozo et al., 1991); y ii) la Paprika se define como el polvo obtenido al secar y moler frutos rojos de variedades semidulces. Es muy empleado en gran cantidad de platos, por ejemplo en el gulash, plato tradicional húngaro. En países de habla hispana, se denomina pimentón al polvo molido de pimiento rojo, sea cual sea su variedad. Se emplea tanto para la realización de alimentos como en la industria chacinera.

Otro uso del que existe conocimiento, es su utilidad como analgésico. Ya desde las antiguas civilizaciones, los mayas empleaban el pimiento para calmar la tos y el dolor de garganta y los aztecas, para combatir el dolor de muelas (Pozo et al., 1991). En la actualidad, los compuestos responsables del carácter picante, denominados capsicinoides, y concretamente la capsicina, se emplean como analgésico en tratamientos de enfermedades dolorosas como artritis (Figura 2). El modo de acción de la capsicina es el siguiente: cuando se aplica a los tejidos, la capsicina provoca la liberación de la llamada sustancia P (un decapeptido involucrado en la sensibilidad del dolor). Dicha sustancia se libera de manera ordinaria cuando los tejidos son dañados, siendo el resorte empleado por el organismo para detectar la lesión. Al aplicar capsicina, se provoca la liberación de la sustancia P, para posteriormente inhibirla, de manera que la sensación de dolor sea más tenue.



Figura 2: Crema de uso tópico cuyo principio activo es la capsicina

También se tienen documentadas otras aplicaciones dentro del ámbito de la medicina con distintos propósitos, como es la pérdida de peso (Lejeune et al., 2003) o la defensa antimicrobiana (Kurita et al., 2002), entre otras.

Otros usos conocidos y derivados de los capsicinoides se encuentran los spray de autodefensa, constituidos a base de capsicina (0,5%), y los ahuyentadores de animales, empleados tanto en jardines como en márgenes de carreteras.

1.5 Denominaciones de origen e importancia

Las Denominaciones de Origen nacen con objeto de preservar la garantía de calidad de los productos por parte de productores y consumidores. Estas se originan a partir del estatuto del vino del año 1932 y posteriormente la Ley 25/1970 los llamados alimentos de “Calidad Diferenciada”. Tienen como particularidad estar protegidos por una normativa de la comunidad europea, la cual garantiza el cumplimiento de unos requisitos superiores a los exigidos en el resto de productos. Engloba productos de origen animal, vegetal, bebidas espirituosas y vinos.

Entre las figuras de calidad diferencia podemos encontrar las Denominación de Origen Protegidas (DOP), Indicación Geográfica Protegida (IGP), Especialidades Tradicionales Garantizadas (ETG). Existe también, en algunas comunidades autónomas, una determinación que se proporciona a ciertos productos que, sin llegar a las condiciones exigidas por el reglamento regulador de las Denominaciones de Origen, contienen unas características determinadas por las cuales han obtenido un reconocimiento, como por ejemplo es el distintivo Eusko Label empleado en la comunidad autónoma vasca. Los productos de calidad diferenciada comercializados bajo estas figuras están protegidos por el Reglamento 1151/2012 de la Unión Europea, que garantiza el cumplimiento de unos requisitos superiores a los exigidos para el resto de productos.

Actualmente en España existen 170 productos, no vínicos, que poseen rasgo diferenciador respecto a la calidad (ya sean DOP o IGP). De todos ellos, 30 pertenecen al grupo de las hortalizas, siendo once de ellos pimientos: Pemento da Arnoia, Pemento de Herbón, Pemento de Oímbra, Pemento do Couto, Pemento do Mougán, Pimiento de Gernika, Pimentón de Murcia, Pimentón de la Vera, Pimiento asado del Bierzo, Pimiento del Piquillo de Lodosa y Pimiento Riojano. Estas tres últimas, destacan por su alto grado de comercialización a nivel nacional e incluso dos de ellas a nivel europeo (Tabla 5).

Tabla 5: Producción, comercialización y valor económico de las diferentes DOP e IGP de hortícolas destinadas a la industria conservera

DOP/IPG	PRODUCCIÓN (t)		COMERCIALIZACIÓN (t)			
	En superficie inscrita	Destinada a conserveras inscritas	Nacional	U.E.	Países Terceros	TOTAL
Alcachofa de Tudela	1.215	524	153,9	0	0	153,9
Berenjena de Almagro	1.359	1.359	1.359	0	0	1.359
Espárrago de Huétor-Tájar	82,3	27,5	56	0	0	56
Espárrago de Navarra	2.989	2.617	1.101	90	2	1.192,8
Grellos de Galicia	0	89.330	55,4	0	0	55,4
Pimiento Asado del Bierzo	72,1	70,1	27,2	0,8	0	28
Pimiento del Piquillo de Lodosa	1.547	1.547	536	20	5	561
Pimiento Riojano	526,5	71	71	0	0	71
TOTAL	7.791,10	95.545,50	3.359,30	110,8	7	3.477,10

Fuente de los datos: Consejos Reguladores de las distintas DOPs e IGP y entidades asimiladas. Datos publicados por la Secretaría General de Agricultura y Alimentación en "Datos de las DOP e IGP de Productos Agroalimentarios año 2012".

Es destacable la importancia del pimiento Piquillo de Lodosa que junto al pimiento Asado del Bierzo y al espárrago de Navarra han conseguido gran reconocimiento, por sus características organolépticas, no solo a nivel nacional. La totalidad de la producción del Piquillo de Lodosa, y la mayor parte del pimiento Bierzo, se destinan para conserva. En el caso del pimiento asado del Bierzo, prácticamente la totalidad de la producción se comercializa a nivel nacional pero en el caso del piquillo de Lodosa una quinta parte de la producción total se exporta a países europeos. También es destacable la parte destinada a países no europeos por parte del Piquillo de Lodosa, la cual supera al espárrago de Navarra, de mayor importancia a nivel nacional.

A continuación se presenta una breve descripción, extraída a partir del pliego de condiciones de las DOP o IGP, de diferentes variedades de pimiento que han sido utilizados en este trabajo:

"Pimiento de Arnoia": poseen la condición de IGP y se caracterizan por ser pimientos de forma cónica, acampanada, de sección longitudinal trapezoidal, con 3 o 4 cascós y 4 costillas y un número variable de septos longitudinales bastante patentes. El ápice puede ser hendido o redondeado, y la zona de inserción del pedúnculo es lobulada. Peso aproximado entre 50 y 90 g por unidad, con una longitud entre 7,5 y 15 cm. La piel es lisa y brillante, de color verde claro (estado inmaduro), oscilando el espesor de la carne entre los 2,6 y los 7,7 mm. El ámbito geográfico de producción comprende un área de 23 km² de

extensión constituida por el término municipal de A Arnoia y por la parroquia de Meréns, perteneciente al municipio de Cortegada. La totalidad del área se encuentra incluida en la Comarca de "O Ribeiro", situada al oeste de la provincia de Orense (MAGRAMA, 2014).

“Pimiento De Couto”: el pimiento “Do Couto” se encuentra amparado por la IGP y se caracteriza por tener la sección longitudinal troncocónica-trapezoidal y sección transversal redondeada. En ocasiones la sección transversal aparece ligeramente surcada y con el extremo apical marcado con tres o cuatro cantos. El peso por fruto oscila entre 4 y 6 g por unidad, siendo su longitud entre 4 y 8 cm y su anchura de 2 cm. El pedúnculo oscila entre 2 y 3 cm, siempre de menor longitud que el fruto. El espesor del pericarpo oscila entre 1 y 1,5 mm. El color de la piel es de color verde oscuro, con poco brillo (estado inmaduro). El área de producción de pimientos amparados por la indicación geográfica protegida está constituida por la totalidad de la comarca del Ferrol, integrada por los siguientes municipios: Ferrol, Narón, Valdoviño, Cedeira, Moeche, As Somozas, San Sadurniño, Neda, Fene, Mugados y Ares. La superficie total asciende a 613,5 km² (MAGRAMA, 2014).

“Pimiento de Herbón”: es el conocido ‘pimiento de Padrón’ que obtuvo el reconocimiento como DOP en el año 2009. Su nombre es el topónimo de la parroquia del ayuntamiento de Padrón en la que se ubica el monasterio al que se vincula la introducción de este pimiento procedente de América. Las características que posee el fruto son: sección longitudinal cónica o troncocónica, siendo ligeramente rugoso y marcando en el ápice 3 o 4 lóculos. El diámetro de la base oscila entre 1,5 y 2 cm, siendo la longitud del fruto entre 3,4 y 5,5 cm. El espesor del pericarpo es aproximadamente 1,5 mm. El peso del fruto oscila entre 3,5 y 4,5 g por unidad. La zona de producción está constituida por los municipios de: Padrón, Dodro, Rois pertenecientes a A Coruña y Pontecesures y Valga de la provincia de Pontevedra (MAGRAMA, 2014).

“Pimiento de Oímbra”: los frutos amparados por esta IGP presentan forma alargada, con 3 o 4 lóbulos en su sección transversal, siendo el ápice picudo o redondeado. La piel es lisa y brillante, de color verde. La longitud es de 10 a 20 cm y el peso por fruto oscila entre 100 y 200 g. El espesor del pericarpo oscila entre 6 y 8 mm. El área de producción está constituida por la totalidad de la comarca orensana de Verín, compuesta por: Oímbra, Verín, Castrelo do Val, Monterrei, Cualedro, Laza, Riós y Vilardevós. La superficie total de esta comarca asciende a 1.000 km² (MAGRAMA, 2014).

“Entenza”: esta variedad se ha obtenido por medio de un programa de selección de pimientos de la variedad Herbón (pimiento de Padrón comercial), siendo sus características morfológicas parecidas, pero eliminando el carácter picante del pimiento de Padrón. En

estos momentos la variedad no posee una figura comercial específica, pero es muy apreciada por los consumidores (Rodríguez Bao et al., 2006).

“Pimiento Asado del Bierzo”: estos pimientos amparados por la IPG se caracterizan por poseer 3-4 lóbulos, conformación alargada, siendo la longitud y anchura superiores a 10 y 6 cm respectivamente. Con respecto a la superficie, las paredes son lisas, con pocas hendiduras y poco marcadas. La piel es tersa y brillante, sin rugosidades ni zonas blandas, de color rojo pálido a rojo oscuro. No se admite que tenga zonas verdes. El ápice está hundido, siendo el espesor del pericarpio inferior a 8 mm. El peso por unidad debe ser superior a 160 g. La zona de producción y de elaboración se encuentra en el centro de la comarca del Bierzo, en la provincia de León, en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Comprende los siguientes términos municipales: Arganza, Bembibre, Borrenes, Cabañas Raras, Cacabelos, Camponaraya, Carracedelo, Carucedo, Castropodame, Congosto, Cubillos del Sil, Molinaseca, Ponferrada, Priaranza, Sobrado, Villadecanes-Toral de los Vados y Villafranca del Bierzo. La superficie de la zona delimitada supone aproximadamente 1.600 km². No se aplica restricción geográfica a la zona de asado del pimiento (MAGRAMA, 2014).

“Ibarrako Piperrak – Guindillas de Ibarra”: esta variedad, que tradicionalmente se conoce como Berezi, se etiqueta bajo el distintivo Eusko Label. Las características distintivas de esta variedad son su fruto estrecho y alargado, entero, consistente, de sección redonda, con color verde amarillento, ligero brillo y uniforme en su coloración. El ápice es agudo y ligeramente curvado, siendo el pedúnculo entero, fino y largo. Longitud de la parte comestible oscilante entre 5 y 12 cm. Con respecto a la delimitación geográfica, los frutos deberán haber sido producidos en la zona atlántica de la Comunidad Autónoma Vasca, con evapotranspiración real (Thornthwaite) igual o superior a 585 mm y con temperatura mínimas en invierno (no excesivamente bajas) y máximas en verano (no excesivamente altas) correspondientes a un clima suave que permita el desarrollo del fruto en las condiciones de calidad previamente señaladas. Para esta variedad se ha trabajado con frutos inmaduros y maduros.

“Pimiento de Gernika” o “Gernikako Piperra”: la variedad Derio junto con la variedad Iker están amparadas bajo esta DOP. Sus características morfológicas son las siguientes: posee 2 o 3 lóbulos, poco marcados, siendo la forma del fruto triangular, estrecha y alargada, con sección elíptica a triangular. El ápice es agudo y el pedúnculo entero, fino y largo. La longitud es de 6 a 12 cm. El peso por fruto se mantiene en la franja de 10 y 12 g. El color oscila entre verde medio y oscuro, con ligero brillo y uniforme en su coloración. La zona geográfica comprende las provincias de Gipuzkoa y Bizkaia y las siguientes zonas de Álava: zona cantábrica alavesa que comprende los municipios de Ayala, Okondo, Llodio, Amurrio y

Artzi-niega y la zona de estribaciones del Gorbea, municipios de Urkabustaiz, Zuya, Zigoitia, Legutiano y Aramaio (MAGRAMA, 2014).

“Luzea”: es una variedad registrada en el año 2002 por Neiker, que posee características que le confieren una especial facilidad para ser asado. Dicha aptitud comenzó a ser demandada por los horticultores vascos dando lugar a un proceso de investigación comenzado en 1998 que tuvo como conclusión la obtención de esta variedad. Se intentó conseguir la denominación Eusko Label, pero debido al problema de suministro continuo de producto, no se consigue dicha denominación (Larregla del Palacio et al., 2008).

“Pimiento del Piquillo de Lodosa”: los pimientos de la variedad Piquillo son los únicos que están protegidos por esta DOP. Se caracterizan por ser de color rojo, forma triangular, ápice agudo, corta longitud, diámetro medio y poco peso por fruto. La zona de producción y elaboración está formada por ocho municipios situados en la “Ribera Baja” de Navarra: Andosilla, Azagra, Carear, Lerín, Lodosa, Mendavia, San Adrián y Sartaguda (MAGRAMA, 2014).

“Pimiento Riojano”: es la variedad Najerano la que se comercializa con esta IGP. Los frutos de esta variedad se caracterizan por tener los pedúnculos de forma cónica y acabado ligeramente en pico, superficie algo rugosa, con 2-3 caras de 16-18 cm de longitud y 6-8 mm de grosor. El color es rojo intenso y el peso por fruto oscila entre 225 y 300 g. El pimiento Najerano es cultivado en los valles de Rioja Baja, Media y Alta, y comercializado tanto en fresco como en conserva (MAGRAMA, 2014).

“Pimentón de la Vera”: para la obtención del producto amparado por la DOP de mismo nombre, se emplean frutos de pimiento de las siguientes variedades: Jaranda, Jariza, Jeromín y Bola. La zona de producción de pimientos para la elaboración de “Pimentón de la Vera” está constituida por los municipios comprendidos en las comarcas naturales de La Vera, Campo Arañuelo, Valle del Ambroz y Valle del Alagón, en el Norte de la provincia de Cáceres (MAGRAMA, 2014).

“Pimentón de Murcia”: esta DOP utiliza la variedad Bola. Se caracteriza por tener una forma subesférica, pericarpio semicarnoso, estando la cavidad del fruto dividida en tres partes iguales, separado por tabiques algo carnosos. La relación de peso seco frente a peso seco será como máximo de 5/1. El fruto es de poco peso. La zona de producción está constituida por los terrenos ubicados en los siguientes términos municipales: Alhama de Murcia, Beniel, Cartagena, Fortuna, Fuente Álamo, Librilla, Lorca, Molina de Segura, Murcia, Puerto Lumbreras, San Javier, Torre Pacheco y Totana. La zona de elaboración y envasado del “Pimentón de Murcia” comprende todos los términos municipales de la provincia de Murcia. La superficie total asciende a 4.844 km² (MAGRAMA, 2014).

Dada la importancia comercial de estas variedades es de interés estudiar uno de los caracteres de calidad más importantes en pimiento, como es el “carácter picante”.

1.6 El carácter picante en pimiento: los capsicinoides

El carácter picante de los pimientos es debido a la presencia de unos metabolitos secundarios denominados capsicinoides, y que únicamente están presentes en el género *Capsicum* (Stewart et al., 2007). Se sintetizan y acumulan en vesículas superficiales del tejido del septo (Figura 3) y/o placenta del fruto, realizándose su biosíntesis entre los 15-25 días después de la antesis (Iwai et al., 1979; Fujiwake et al., 1982; Stewart et al., 2007). La sensación picante de los frutos depende tanto del tipo de capsicinoide presente, como de su abundancia en el fruto. De todos los capsicinoides conocidos, la capsicina (CAP) y la dihidrocapsicina (DHC) son los mayoritarios, llegando a representar un 90 % del contenido total de la mezcla (Govindarajan et al., 1987).

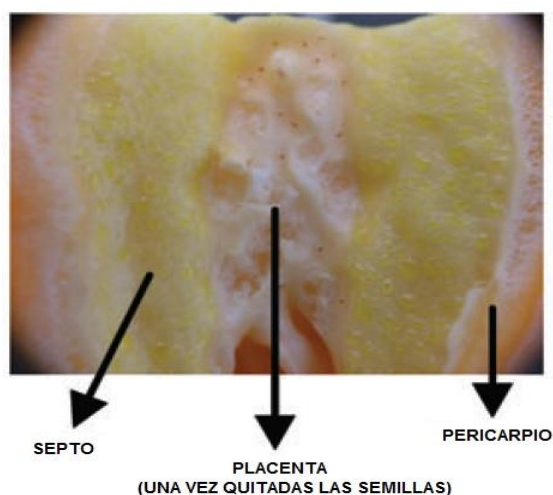


Figura 3: Corte longitudinal de un fruto de pimiento

En la actualidad, hay descritos 18 capsicinoides diferentes (Tabla 6; Maillard et al., 1997; Thompson et al., 2005a; Thompson et al., 2005b; Schweiggert et al., 2006). Su biosíntesis está basada en la condensación del anillo fenólico (la vanillilamina), sintetizado vía fenilpropanoides) y que es común a todos los capsicinoides, con una cadena de ácido graso que deriva del aminoácido valina, leucina o isoleucina, y que difiere para cada capsicinoide en la longitud (de 8 a 13 átomos de carbono) y saturación de la cadena (Kim et al., 2014; Figura 4). El paso final de condensación es regulado por la enzima *Capsicina sintasa* (CS o *Pun-1*).

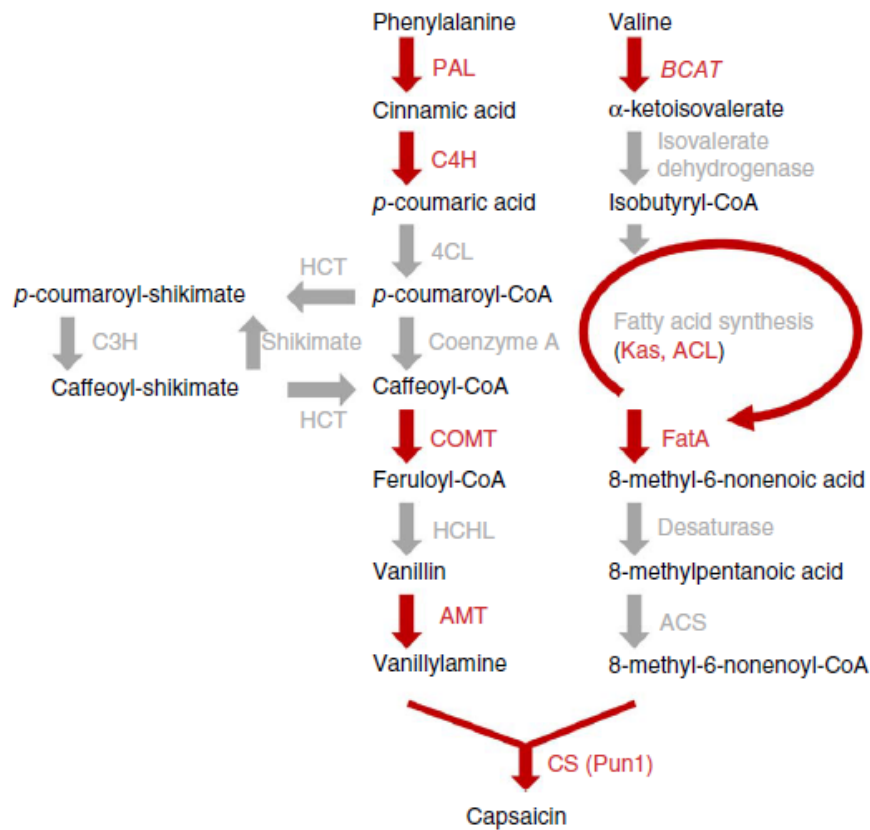
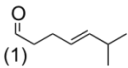
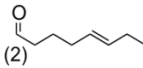
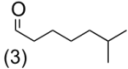
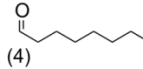
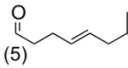
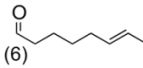
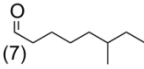
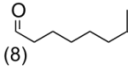
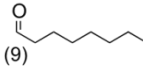
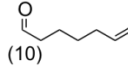
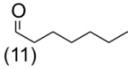
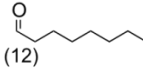
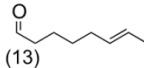
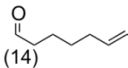
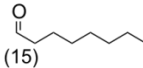
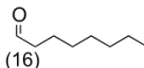
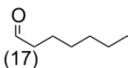
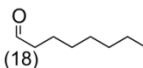


Figura 4: Ruta de biosíntesis propuesta para los capsaicinoides. Las enzimas participantes en la ruta se representan en color rojo. (Fuente Kim et al., 2014)

Tabla 6: Estructuras químicas, fórmula empírica, peso molecular y relación masa-carga (m/z) de los capsicinoides clasificados en función de la posición del metil en la cadena acil (anteiso, iso o lineal). (1) 4-ene-6-metil nornorcapsicina; (2) N-vainillin 5-octenamida; (3) 6-metil nornordihidrocapsicina; (4) N-vainillin octanamida; (5) 4-ene-7-metil norcapsicina; (6) N-vainillin 6-nonenamida; (7) 6-metil nordihidrocapsicina; (8) 7-metil nordihidrocapsicina; (9) N-vainillin nonanamida; (10) 6-ene-8-metil capsicina [capsicina]; (11) 8-metil dihidrocapsicina [dihidrocapsicina]; (12) N-vainillin decanamida; (13) 6-ene-8-metil homocapsicina; (14) 6-ene-9-metil homocapsicina; (15) N-vainillin 8-undecenamida; (16) 8-metil homodihidrocapsicina; (17) 9-metil homodihidrocapsicina; (18) N-vainillin undecanamida.

R			Fórmula empírica	Peso molecular	m/z
Anteiso	Iso	Lineal			
			$C_{16}H_{23}NO_3$	277.36	278.17
			$C_{16}H_{25}NO_3$	279.37	280.19
			$C_{17}H_{25}NO_3$	291.39	292.19
			$C_{17}H_{27}NO_3$	293.40	294.20
			$C_{18}H_{27}NO_3$	305.41	306.20
			$C_{18}H_{29}NO_3$	307.43	308.22
			$C_{19}H_{29}NO_3$	319.44	320.22
			$C_{19}H_{31}NO_3$	321.45	322.23

1.7 Métodos de determinación y cuantificación de los capsicinoides

Distintas metodologías analíticas han sido desarrolladas para identificar los dos capsicinoides mayoritarios, CAP y DHC. Se han empleado técnicas de cromatografía: en papel, de gases y líquida en alta resolución (HPLC) acopladas a distintas técnicas de detección de Ultravioleta-visible (UV-Vis) (Contreras-Padilla & Yahia 1998), fluorescencia (Collins et al., 1995) y espectrometría de masas (Garcés-Claver et al., 2006). De las técnicas anteriores, la cromatografía líquida (HPLC) en alta resolución acoplada a UV, ha sido la más utilizada por su rapidez, pero está limitada por dos aspectos básicos como son la selectividad y la sensibilidad.

Pocos métodos han sido desarrollados para la identificación de los capsicinoides minoritarios, dado que estos compuestos se hallan en muy bajas concentraciones y muchos de ellos son isómeros lo que dificulta su separación cromatográfica. La detección por masas (MS), acoplada a la HPLC mediante ionización (ESI) proporciona mayor selectividad y

sensibilidad, pudiendo determinar con gran precisión (precisión de masa <5 ppm) y exactitud qué tipo de capsicinoides están presentes en función de su relación masa-carga (m/z) y de las moléculas originadas por su fragmentación, permitiendo asignar una fórmula empírica con gran precisión y obtener información de su estructura (presencia del anillo y longitud y saturación de las cadenas) (Bristow, 2006). La fragmentación de los capsicinoides siempre dará lugar a un ión común perteneciente al anillo (m/z 137) y iones característicos de cada capsicinoide que derivarán de la cadena que tengan. Esta fragmentación permite una detección inequívoca de cada capsicinoide, que mediante detección por UV no es posible. El desarrollo de esta metodología y su aplicación en extractos de frutos de pimiento, permitiría una identificación del perfil de capsicinoides presentes en extractos de frutos de pimiento.

2 OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es la identificación los metabolitos secundarios relacionados con el carácter picante en variedades españolas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de reconocida calidad diferenciada.

Para conseguir este objetivo se han establecido los siguientes subobjetivos:

- La aplicación de un método analítico de HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) para la identificación de los capsicinoides mayoritarios (capsicina y dihidrocapsicina) y minoritarios a partir de extractos de pimiento.

Para ello se utilizará un método analítico de alta resolución mediante espectrometría de masa en tándem, HPLC-ESI-MS/MS(QTOF), que permitirá determinar con precisión la relación masa-carga (m/z) tanto de los iones de los metabolitos (iones padres), así como de los iones productos originados en su fragmentación. Además, la exactitud en la medición de los iones facilitará la asignación de una fórmula empírica (combinación específica de átomos) para estos compuestos, que reconfirmará la identidad de los compuestos.

- La obtención de los perfiles de capsicinoides para cada fruto y para las variedades de pimiento utilizadas.

Para cada fruto analizado se identificarán los capsicinoides presentes mediante la medición de la masa exacta del compuesto, el análisis del patrón específico de fragmentación (huella de fragmentación y análisis de masas exactas de los iones productos) y la asignación de una fórmula empírica.

- Estimación del nivel de picor de las distintas variedades españolas de pimiento de reconocida calidad diferenciada.

Para ello se realizará la cuantificación del contenido de capsicina y dihidrocapsicina de cada fruto y se compararán los resultados obtenidos en las distintas variedades.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Se han utilizado un total de 14 entradas de pimiento (*C. annuum* L.), que destacan por ser variedades que se comercializan bajo una calidad diferenciada, ya sea regional o nacional (Tabla 7) y por tanto con una reconocida calidad superior. Cuatro frutos de cada una de estas variedades fueron suministradas por las diferentes asociaciones o empresas adscritas con la figura de calidad diferenciada de cada variedad de pimiento (Figura 5 y Figura 6).

Tabla 7: Tipo de Reconocida Calidad Diferenciada, variedad de pimiento e información disponible del picor de los frutos analizados.

Nombre IGP/DOP	Figura de calidad diferenciada	Variedad	carácter picante
Pimiento de Arnoia	IGP	Arnoia	No picante
Pimiento de Oímbra	IGP	Oímbra	No picante
Entenza	Variedad mejorada	Entenza	No picante
Pimiento del Couto	IGP	Couto	No picante
Pimiento de Herbón	DOP	Padrón	Picante
Pimiento Asado del Bierzo	IGP	Bierzo	Picante
Guindilla de Ibarra	Eusko Label	Berezi	Picante
Pimiento de Gernika	DOP	Derio	No picante
Luzea	Variedad mejorada	Luzea	No picante
Pimiento Piquillo de Lodosa	DOP	Piquillo	Picante
Pimiento Riojano	IGP	Najerano-Leiva	No picante /picante
Pimiento Riojano	IGP	Najerano-Tricio	No picante /picante
Pimentón de la Vera	DOP	Vera	No picante /picante
Pimentón de Murcia	DOP	Bola	No picante

Para la variedad Najerano, IGP Pimiento Riojano, dos empresas adscritas a esta IPG enviaron frutos, desde la localidad de Leiva se enviaron dos y otro dos desde Tricio. Puesto que se recibieron de localidades diferentes se trataron en los posteriores análisis como entradas diferentes. La distribución geográfica de las distintas variedades se puede observar en la Figura 5.

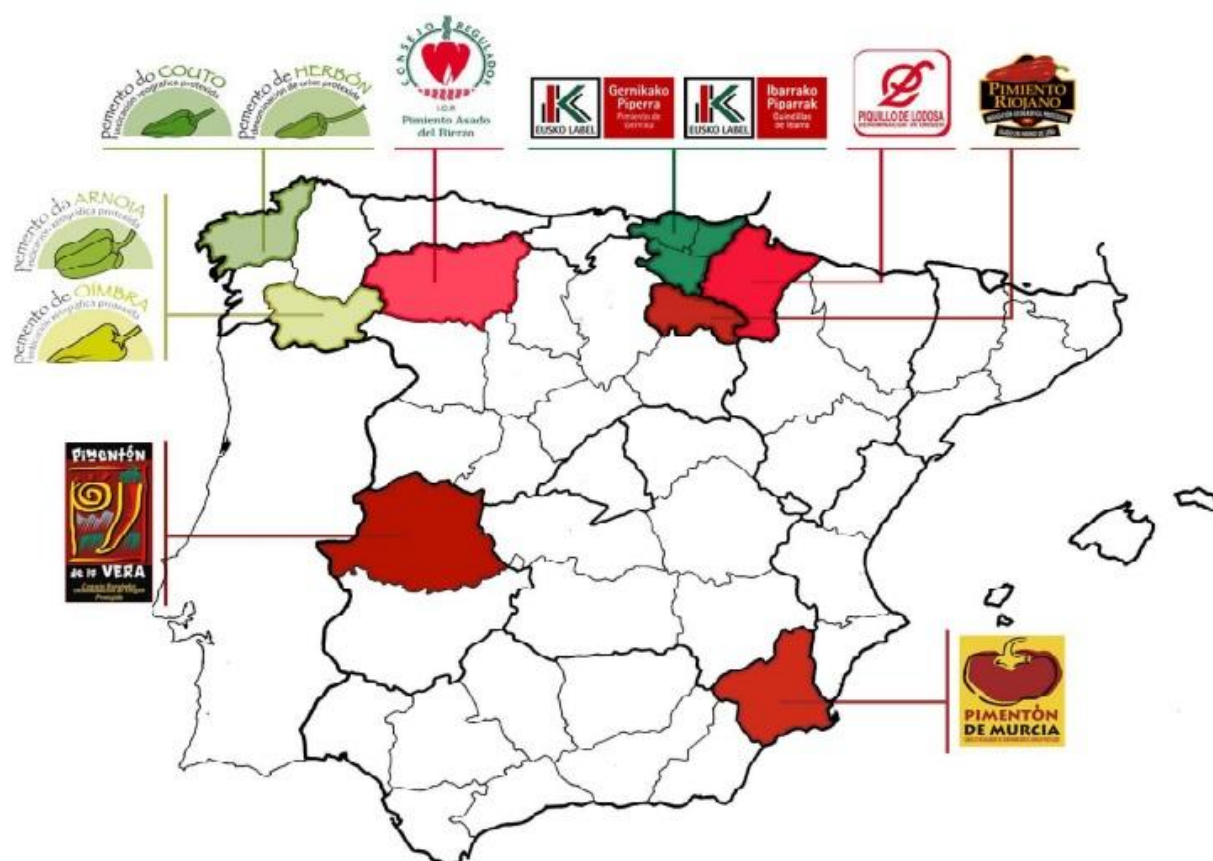


Figura 5: Distribución geográfica de las variedades de pimiento utilizadas en este trabajo

Para todas las variedades, los frutos se recibieron en estado maduro (color rojo), excepto para las variedades Berezi, Derio y Luzea que se enviaron frutos en los dos estados, maduro (color rojo) e inmaduro (color verde). Los frutos fueron procesados para obtener el extracto de capsicinoides como en el apartado siguiente se describe.

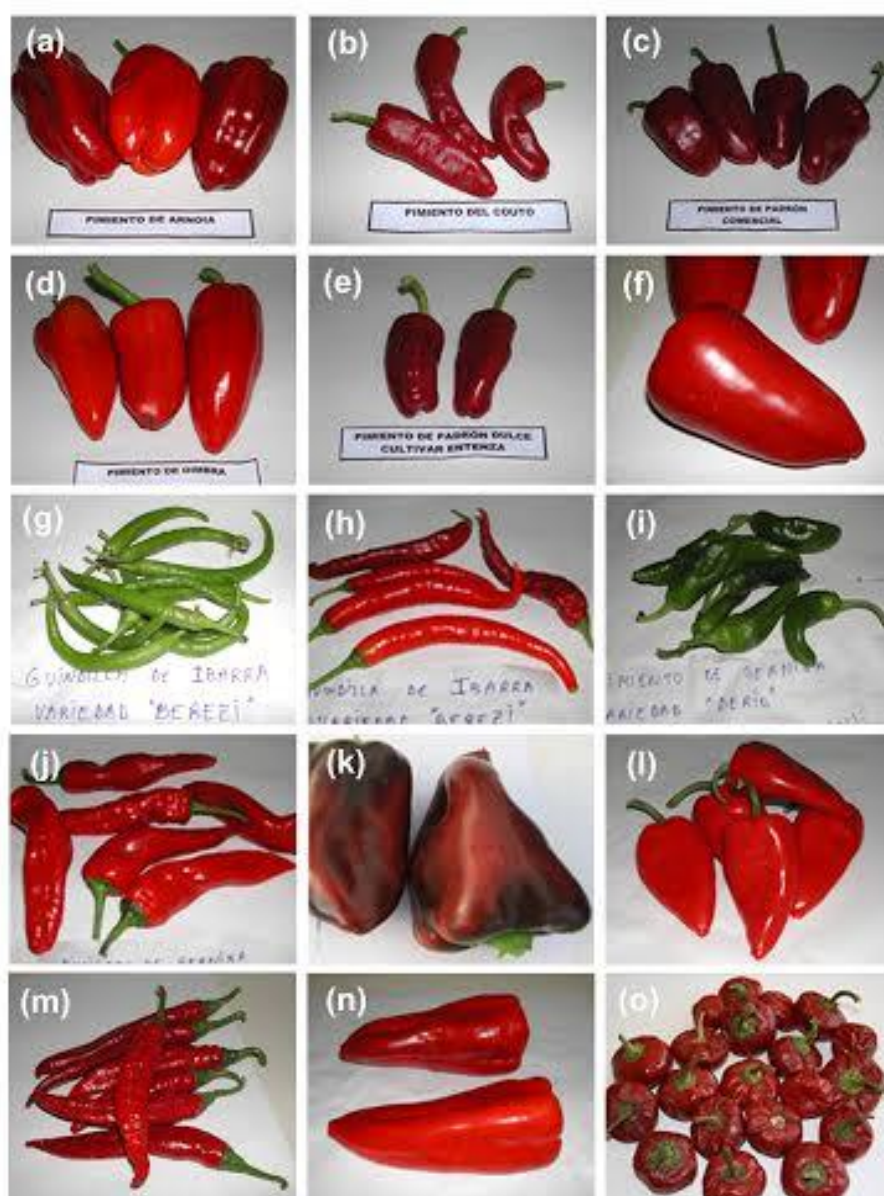


Figura 6: Variedades suministradas por las diferentes asociaciones o empresas adscritas con una figura de calidad diferenciada. a) Arnoia, b) Couto, c) Herbón, d) Oímbra, e) Entenza, f) Bierzo, g) Berezzi Inmaduro, h) Berezzi Maduro, i) Derio Inmaduro, j) Derio Maduro, k) Luzea, l) Piquillo, m) Vera, n) Najerano (Tricio), y o) Bola

3.2 Reactivos y soluciones

Todos las soluciones, estándares, tampones y eluyentes fueron preparados con agua de grado analítico tipo I (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA). Capsicina (CAP) (8-metil-N-vanillil-trans-6-nonenamida) ($\geq 97\%$), dihidrocapsicina (DHC) (8-metil-N-vanillilnonamida) ($\geq 90\%$), metanol ($\geq 99.9\%$, grado LC-MS), ácido acético, Na-acetatos [10 mM NaOH, 2.5% (v/v) de ácido acético y 50% (v/v) 2-propanol], acetonitrilo (grado LC-MS) fueron comprados

en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El análogo de la capsaicina (4,5-dimetooxibenzil)-4-metiloctamida (DMBMO) fue sintetizado según el método Cooper et al. (1991) y utilizado como estándar interno (SI).

3.3 Extracción de capsicinoides

Para la extracción de los capsicinoides se siguió el método descrito por Garcés-Claver et al. (2006). Los frutos fueron secados a 55°C durante 4-5 días y, posteriormente, molidos en un molinillo Polytron. A cien miligramos de muestra de tejido seco se añadió 1 ml de acetonitrilo puro, con una pequeña cantidad del estándar interno (SI) (4,5-dimetoxibenzil)-4-metiloctamide (DMBMO) para obtener una concentración final de 5 µM de DMBMO. La suspensión de polvo seco en acetonitrilo fue agitada a temperatura ambiente durante una hora (empleando un agitador orbital de New Brunswick Scientific, Edison, NJ, trabajando a 250 rpm), para posteriormente ser llevada a un baño de agua caliente, sin agitar, a 65°C durante una hora. La mezcla se agitó otra vez a temperatura ambiente durante una hora en las condiciones anteriormente citadas. Luego, la suspensión se centrifugó durante 15 min a 16.000 g, y el sobrenadante se recogió y llevó a 1 ml de acetonitrilo. Para finalizar, el sobrenadante se filtró antes de realizar el análisis, empleando filtros de membrana 0,45 y 0,22 µm PVDF (Millipore, Bedford, MA). Se realizaron 3 réplicas de cada extracto.

3.4 Método analítico HPLC-ESI-MS

La separación cromatográfica se realizó en un sistema HPLC serie1100 (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania). Se utilizó la columna analítica HPLC C18 column (Symmetry C18, 150 x 2,1 mm; 3,5 µm de tamaño esférico de partículas, Waters, Milford, MA, EEUU) acoplada en serie a una precolumna (Symmetry C18 10 mm x 2,1 mm; 3,5 µm de tamaño esférico de partículas, Waters). Las condiciones de HPLC fueron: como solventes se utilizaron el metanol (solvente A) y el agua Milli-Q acidificada con 2,5% (v/v) de ácido acético (solvente B); el flujo fue de 250 µLmin⁻¹; la temperatura de la columna 25°C; y el volumen de inyección 5 µl. El programa de elución comenzó con un gradiente lineal de 50 a 60% A en 30 min, se mantuvo 30 min a esta composición, y posteriormente se incrementó la concentración de A de 60 a 70% en dos min, y se mantuvo en esta composición durante 8 min. Finalmente, la concentración de A disminuyó hasta 50% en 5 min y se mantuvo 10 min más.

La detección de los capsicinoides se realizó por acoplamiento del sistema de HPLC a un espectrómetro de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo [quadrupole time-of-flight (QTOF)]

equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y una válvula divergente de seis puertos (microTOF-Q™ Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los análisis de ESI-MS²(QTOF) se realizaron en modo positivo, utilizando Argón como gas de colisión. Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de m/z 50–800 y los análisis de MS/MS fueron realizados de forma automatizada seleccionando como iones precursores los cinco más intensos y con una m/z en el rango de 270-350, que incluye las m/z los iones $[M+H]^+$ correspondientes a los capsicinoides conocidos. El eje de masas fue calibrado utilizando un conjunto de Na-acetatos [10 mM NaOH, 2.5% (v/v) de ácido acético y 50% (v/v) 2-propanol].

El programa informático utilizado fue el Bruker Daltonik software, que incluye el micrOTOF Control v.2.3, el HyStar v.3.2 y el Data Analysis v.4.0 para controlar el equipo MS(QTOF), la conexión del sistema HPLC con el MS y el procesador de datos respectivamente. Para las asignaciones de las fórmulas moleculares de los iones producto se utilizaron las herramientas Smart Formula y Smart Formula 3D™ que viene en el mismo programa.

3.5 Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias existentes entre los contenidos de CAP y DHC de las distintas muestras de pimientos analizadas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para los datos transformados de las concentraciones de CAP y DHC. También se estudió la correlación entre las variables. Dado que la prueba de normalidad, determinó que los datos obtenidos no presentaban una distribución normal, estos fueron transformados, $\log(x+1)$, con el fin de realizar un correcto análisis estadístico. Las diferencias entre las variedades se compararon con la prueba de rango múltiple de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$). Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI v16.2.04 (StatPoint Technologies, Inc.).

Para estudiar la relación entre las entradas, la presencia de los capsicinoides se clasificó por el criterio de presencia (1) / ausencia (0) y se creó un archivo en forma de matriz binomial. A partir de esos datos, se estimó la similitud entre entradas utilizando el coeficiente Dice. Con los valores obtenidos se construyó una matriz de similitud. Estos cálculos se realizan mediante el programa NTSYSpc versión 2.11 (Rohlf, 2000).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de capsicinoides mayoritarios y minoritarios mediante HPLC-ESI-MS/MS(QTOF).

Los analitos fueron separados con un gradiente de solventes en una columna C18 y el espectro de masas fue adquirido por ESI-MS(QTOF) en el rango de masas de m/z 50–800 durante toda la carrera cromatográfica, obteniéndose cromatogramas 3-D (tiempo, m/z e intensidad).

Para una solución combinada de los estándares de CAP, DMBMO y DHC se extrajeron los cromatogramas de los iones para los valores de m/z correspondientes al $[M+H]^+$ de cada analito. Los resultados mostraron que el método HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) fue capaz de resolver correctamente los estándares de CAP, DMBMO y DHC cuando están juntos en una misma solución con tiempos de resolución de 32,3 min, 37,1 min y 44,6 min, respectivamente.

A partir de los extractos de fruto de las distintas variedades se extrajeron los cromatogramas de los iones para los valores de m/z correspondientes a los $[M+H]^+$ de cada analito descrito en la Tabla 6 y del SI (m/z 308,22). Un ejemplo de cromatograma a partir de un extracto de “Berezi” se presenta en la Figura 8.

Dos de los dieciocho compuestos, picos 10 y 11, y el SI, en Figura 8, coincidieron en RT y m/z con los valores de los estándares de CAP, DHC y SI. Además, la identidad de estos tres compuestos fue confirmada por comparación de los espectros de fragmentación obtenidos en el MS/MS de los compuestos con los obtenidos para los estándares (Figura 7), tanto para los valores de m/z , como para las intensidades relativas de los iones fragmentados (Tabla 8).

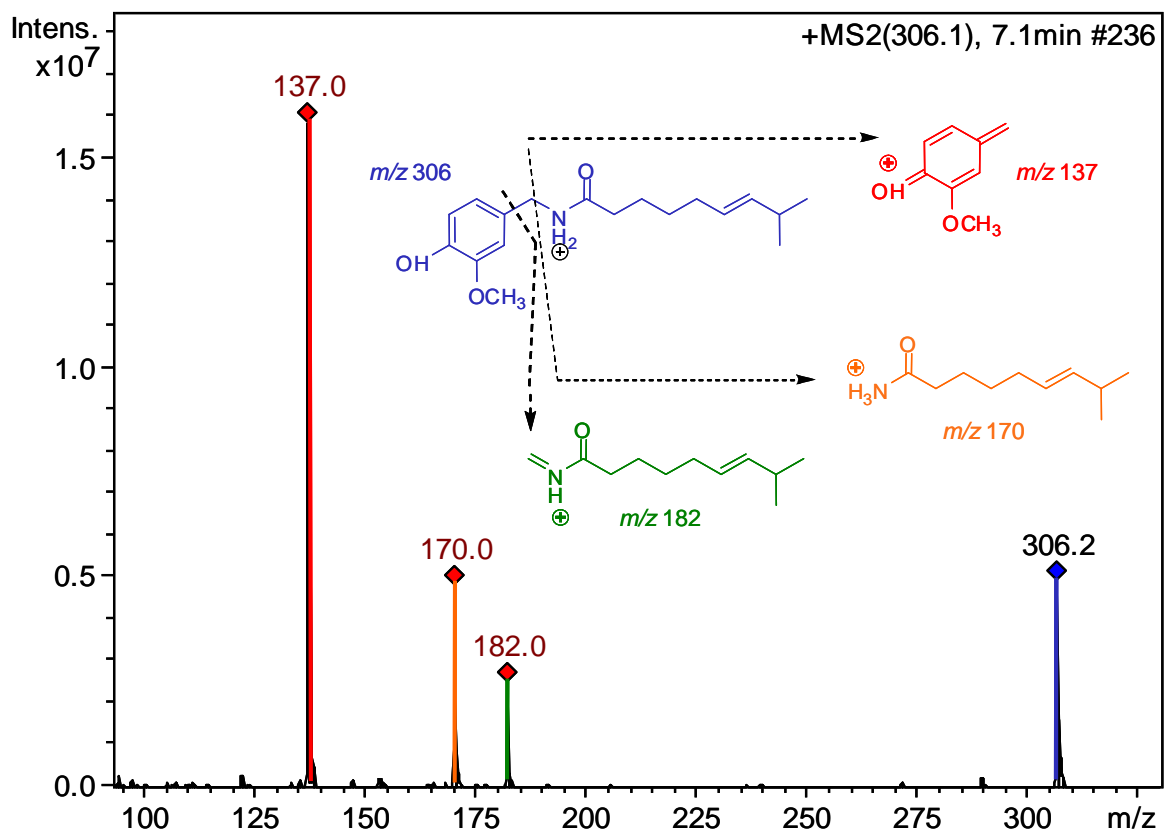


Figura 7. Patrón de fragmentación MS/MS característico de la capsicina (m/z 306) (fuente: Rodríguez et al., 2010)

El compuesto 12 tiene el mismo valor de m/z y la misma fórmula empírica que el compuesto 11 (DHC) (Tabla 6), pero eluye 4,1 min después, lo cual sugiere que este compuesto es un isómero de la DHC. Este compuesto se identificó como N-vainillin decanamida (12) (Tabla 6).

Al igual que ocurre con los compuestos 11 (DHC) y 12, también se observó que para las parejas de los compuestos 5 y 6, 7 y 8, 13 y 14, y 16 y 17 (Figura 8), coincidían para el valor de m/z y fórmula empírica, y que en todos los casos uno de ellos eluía más tarde que el otro por lo que se tratan de isómeros. Estos compuestos fueron asignados en función del valor de m/z exacta, de la fórmula empírica, del patrón de fragmentación y de la m/z exacta de los iones producto (Tabla 8) con el 4-ene-7-metil norcapsicina (5) y N-vainillin 6-nonenamida (6); 6-metil nordihidrocapsicina (7) y 7-metil nordihidrocapsicina (8); 6-ene-8-metil homocapsicina (13) y 6-ene-9-metil homocapsicina (14); 8-metil homodihidrocapsicina (16) y 9-metil homodihidrocapsicina (17), respectivamente.

Al extraer la m/z 278,17 que corresponde a los isómeros 4-ene-6-metil nornorcapsicina (1) y N-vainillin 5-octenamida (2), se obtuvo únicamente un pico (1 ó 2) (Figura 8). La asignación de este compuesto a uno de los dos isómeros de la pareja fue confirmada por el

valor de m/z exacta y por la determinación de su fórmula empírica (Tabla 8). Además, el espectro de MS/MS reconfirmó que el patrón de fragmentación del compuesto era el típico de los capsicinoides y que la m/z exacta correspondía a la de los iones productos. Sin embargo, no se pudo determinar cual de los dos isómeros era de la pareja. Lo mismo sucedió con el pico (3 ó 4), obtenido al extraer la m/z 280,19, correspondiente a la pareja de isómeros 6-metil nornordihidrocapsicina (3) y N-vainillin octanamida (4).

Tabla 8. Tiempo de Retención (RT), relación masa-carga exacta de $[M+H]^+$ (m/z), fórmula elemental y error de los capsicinoides biosintetizados en un fruto de la variedad Berezi en estado maduro. Los números entre paréntesis hacen referencia a los compuestos de la Tabla 6 y la Figura 8

Measured m/z	Elemental formula	Calculated m/z	Error (mDa)	mSigma Fit value
(1) RT = 21.6				
278,1768	$C_{16}H_{26}NO_3$	278,1751	-1,7	
(3) RT = 20.3				
280,1936	$C_{16}H_{26}NO_3$	280,1907	-2,9	
122,0352	$C_7H_6O_2$	122,0362	1	43,8
137,0571	$C_8H_9O_2$	137,0597	2,6	18,4
144,1345	$C_8H_{18}NO$	144,1383	3,8	52,1
(5) RT = 22.2				
292,1917	$C_{16}H_{26}NO_3$	292,1907	-1	
122,0287	$C_7H_6O_2$	122,0362	7,5	n.d.
137,0579	$C_8H_9O_2$	137,0597	1,8	3,2
156,1302	$C_9H_{18}NO$	156,1383	8,1	n.d.
168,1374	$C_{10}H_{18}NO$	168,1383	0,9	n.d.
(6) RT = 26.6				
292,1930	$C_{16}H_{26}NO_3$	292,1907	-2,3	
(7) RT = 29.8				
294,2064	$C_{16}H_{28}NO_3$	294,2064	0	
122,0339	$C_7H_6O_2$	122,0362	2,3	43,8
137,0556	$C_8H_9O_2$	137,0597	4,1	19
141,1223	$C_9H_{17}O$	141,1274	5,1	n.d.
158,1491	$C_9H_{20}NO$	158,1539	4,8	10
170,1456	$C_{10}H_{20}NO$	170,1539	8,3	n.d.
[8] RT = 32.6				
294,2062	$C_{16}H_{28}NO_3$	294,2064	0,1	
(10) RT = 32.3				
306,2082	$C_{18}H_{28}NO_3$	306,2064	-1,8	
122,0341	$C_7H_6O_2$	122,0362	2,2	11,3
137,0561	$C_8H_9O_2$	137,0597	3,6	19,6
170,1500	$C_{10}H_{20}NO$	170,1539	3,9	64,7
(11) RT = 44.6				
308,2236	$C_{18}H_{30}NO_3$	308,2220	-1,6	
122,0337	$C_7H_6O_2$	122,0362	2,5	11,6
137,0561	$C_8H_9O_2$	137,0597	3,6	19
155,1391	$C_{10}H_{19}O$	155,1430	3,9	n.d.
172,1651	$C_{10}H_{22}NO$	172,1696	4,5	18
184,1652	$C_{11}H_{22}NO$	184,1696	4,4	70,9

Measured m/z	Elemental formula	Calculated m/z	Error (mDa)	mSigma Fit value
(12) RT = 48.7				
308,2237	$C_{18}H_{30}NO_3$	308,2220	-1,6	
122,0373	$C_7H_6O_2$	122,0362	-1,1	784,5
137,0616	$C_8H_9O_2$	137,0597	-1,9	15,4
155,1438	$C_{10}H_{19}O$	155,1430	-0,8	62,5
172,1713	$C_{10}H_{22}NO$	172,1696	-1,7	64,7
184,1815	$C_{11}H_{22}NO$	184,1696	-11,9	n.d.
(13) RT = 46.8				
320,2238	$C_{19}H_{30}NO_3$	320,2220	-0,8	
122,0377	$C_7H_6O_2$	122,0362	-1,5	784,5
137,0613	$C_8H_9O_2$	137,0597	-1,6	11
167,1433	$C_{11}H_{19}O$	167,1430	-0,3	n.d.
184,1728	$C_{10}H_{22}NO$	184,1696	-3,2	n.d.
196,1701	$C_{12}H_{22}NO$	196,1696	-0,5	n.d.
(14) RT = 47.9				
	$C_{19}H_{30}NO_3$	320,2220		
122,0377	$C_7H_6O_2$	122,0362	-1,5	784,5
137,0613	$C_8H_9O_2$	137,0597	-1,6	16,6
167,1433	$C_{11}H_{19}O$	167,1430	-0,3	n.d.
184,1728	$C_{10}H_{22}NO$	184,1696	-3,2	n.d.
196,1701	$C_{12}H_{22}NO$	196,1696	-0,5	n.d.
(16) RT = 66.7				
322,2375	$C_{18}H_{32}NO_3$	322,2220	0,1	
122,0383	$C_7H_6O_2$	122,0362	-2	784,5
137,061	$C_8H_9O_2$	137,0597	-1,3	12,3
169,1622	$C_{11}H_{21}O$	169,1587	-3,5	n.d.
186,1845	$C_{11}H_{24}NO_2$	186,1852	0,8	70,9
198,1854	$C_{12}H_{24}NO$	198,1852	-0,2	n.d.
(17) RT = 68.2				
322,2376	$C_{18}H_{32}NO_3$	322,2220	0,1	
122,0366	$C_7H_6O_2$	122,0362	-0,4	11,6
137,06	$C_8H_9O_2$	137,0597	-0,3	17,2
169,1622	$C_{11}H_{21}O$	169,1587	-3,5	n.d.
186,1841	$C_{11}H_{24}NO_2$	186,1852	1,2	19,6
198,1854	$C_{12}H_{24}NO$	198,1852	-0,2	n.d.

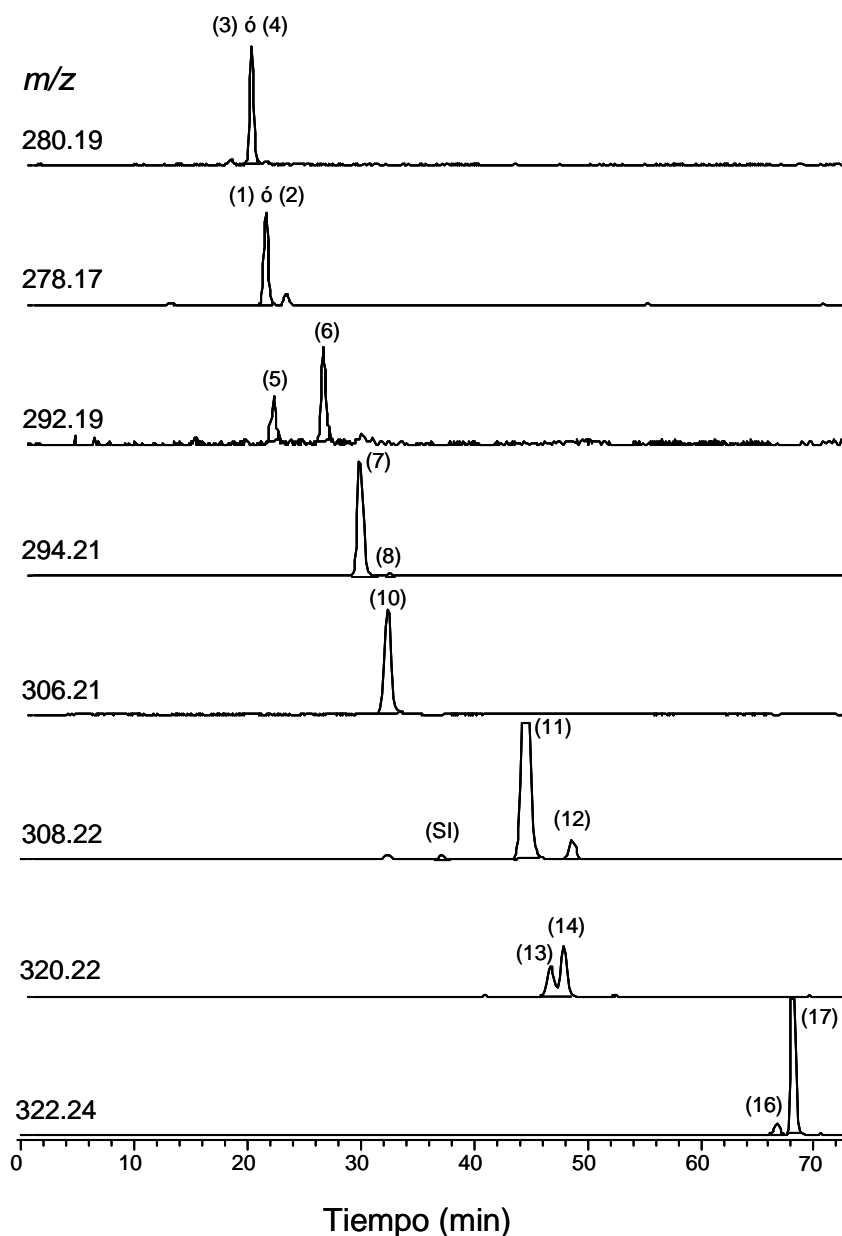


Figura 8: Cromatograma obtenido a partir de un extracto de fruto de la variedad Berezi en estado maduro. Los números entre paréntesis hacen referencia al compuesto (Tabla 6). (SI) hace referencia al estándar interno DMBMO.

No se observó ningún pico cuando se extrajeron las m/z 294,21, 320,22 y 322, 24 correspondiente a los compuestos 9, 15 y 18 (Tabla 6) en los extractos de pimienta analizados de la variedad Berezi, pero sí que se detectaron en un extracto de fruto analizado (Padrón 9) de la variedad Padrón (Anexo I).

Podemos concluir que el método HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) utilizado para detectar capsicinoides a partir de extractos de fruto de pimienta permitió la separación y detección con exactitud y precisión de 16 capsicinoides conocidos. Dos de los capsicinoides detectados no pudieron ser asignados respectivamente a un isómero específico de las

parejas de isómeros 1 y 2 y 3 y 4, bien porque ambos isómeros estaban coeluyendo, bien porque alguno de los ellos no estaba presente en las muestras, no pudiéndose detectar y por tanto diferenciar 1 de 2 y 3 de 4.

4.2 Análisis cualitativo de la composición de capsicinoides

En la Tabla 9 se presentan los perfiles de capsicinoides en las distintas variedades. De las 14 variedades analizadas, en 4 de ellas, Couto, Entenza, Luzea y Oímbra, no se detectó ningún capsicinoide, por lo que se pueden considerar no picantes. Estas cuatro variedades son consideradas no picantes según la información disponible en sus pliegos de condiciones para las IGP de Pimiento del Couto y de Pimiento de Oimbra (MAGRAMA, 2014), para las variedades Luzea y Entenza en los documentos publicados por Larregla del Palacio et al. (2008) y Rodríguez Bao et al. (2006), respectivamente, por tanto los resultados obtenidos reafirman esta información.

En las variedades Arnoia, Berezi, Bierzo, Bola, Derio, Leiva, Padrón, Piquillo, Tricio y Vera se detectó al menos en un extracto de fruto un capsicinoide (Tabla 9), por tanto se consideran picantes. Sin embargo, en la información disponible en los pliegos de condiciones de la IGP de Pimiento de Arnoia y de las DOP de Pimiento de Murcia (variedad Bola) y Pimiento de Gernika (variedad Derio) son consideradas no picantes.

Estos datos no coinciden con los resultados obtenidos. Para el caso de Arnoia, los frutos analizados presentaron CAP y DHC pero su estado era maduro (color rojo). Sólo los pimientos en estado inmaduro (color verde) están enmarcados dentro de esta IGP (Pimiento de Arnoia). En el estado inmaduro, y depende del número de días después de la antesis, o bien los capsicinoides todavía no han comenzado a sintetizarse o bien, si lo han hecho, pueden encontrarse en concentraciones no detectables. Por tanto, podría ser esperado que estos frutos analizados no picaran en su estado de inmadurez.

Las variedades Bola y Derio (Pimiento de Gernika), este último comercializado en estado inmaduro (color verde), son consideradas no picantes según la información disponible (MAGRAMA, 2014). Sin embargo, se detectó CAP en alguno de los frutos analizados en estado maduro para ambos, pero como se verá en el siguiente apartado, las concentraciones obtenidas fueron muy bajas (0,13 y 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente), pudiendo ser concentraciones no detectables por el umbral de percepción organoléptica. DHC sólo fue detectado en un fruto de la variedad Bola, pero a concentración no cuantificable. Los frutos de la variedad Derio en estado inmaduro (momento de comercialización) no han presentado ni CAP ni DHC, coincidiendo con la información disponible.

La IGP de Pimiento Riojano ampara el pimiento de la variedad Najerano considerada como dulce según la información disponible en los pliegos de condiciones (MAGRAMA, 2014). En este trabajo se analizaron frutos de esta variedad procedentes de Leiva y Tricio y mostrando concentraciones medias de CAP de 111,90 y 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente, y 76,06 y 0,00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente, de DHC. Para Tricio sólo se analizaron dos frutos, y en ambos los valores de DHC fueron nulos y los de CAP muy bajos, indicando que podría no apreciarse el nivel de picor organolépticamente, si así fuera podría considerarse no picante a nivel gustativo. Para Leiva, también se analizaron sólo dos frutos, mientras que en uno de ellos no se detectó ningún capsicinoide en el otro se detectaron tanto CAP como DHC. Esto podría ser debido a la gran variabilidad del carácter picante en las variedades (DeWitt y Bosland, 1993; Contreras-Padilla et al., 1998; Estrada et al., 2000; Estrada et al., 2002). Sería necesario analizar más frutos de esta IGP para poder confirmar estos resultados.

Respecto a las DOP Pimiento de Herbón (variedad Padrón), Pimiento Piquillo de Lodosa (variedad Piquillo) y Pimentón de la Vera, la IGP Pimiento Asado del Bierzo y la Eusko Label Guindilla de Ibarra (variedad Berezi), la información disponible (MAGRAMA, 2014; Reglamento REG-IP, 2013, respectivamente) indica que son picantes. Los resultados obtenidos en este trabajo lo han confirmado.

Se observó variabilidad para el número de capsicinoides detectados. Hay variedades en las que no se detectó ningún capsicinoide en alguno de sus frutos analizados mientras que en los otros se detectó al menos uno, siendo siempre CAP (10). Por ejemplo: en la variedad Najerano procedente de Leiva, en un fruto se detectó CAP (10) y DHC (11) mientras que en otro fruto no se detectó ninguno. Lo mismo sucedió para las entradas analizadas de Piquillo y Derio en estado maduro. Para esta última variedad, cuando se analizaron los frutos en estado inmaduro no se detectó ningún capsicinoide (Tabla 9).

Para las entradas Arnoia, Berezi, Bierzo, Bola, Padrón y Vera siempre se detectó al menos un capsicinoide en todos los frutos analizados. Sin embargo, mostraron variabilidad para el número de compuestos detectados en cada fruto. Por ejemplo: para Berezi, mientras que en un fruto sólo se detectó CAP (10), en otro fruto se detectaron, además de CAP (10), DHC (11) y el compuesto 7. El fruto en el que más capsicinoides se detectaron, un total de 13, pertenece a la variedad Berezi (Guindillas de Ibarra), seguido por un fruto de la variedad Padrón (Pimiento de Herbón) con 11 capsicinoides detectados (Tabla 9).

Para las tres variedades en las que se analizaron frutos en diferentes estados de madurez: i) Luzea no presentó capsicinoides ni en estado inmaduro ni maduro; ii) Derio sólo presentó CAP en estado maduro y no se detectó ningún compuesto en su estado inmaduro;

iii) y en Berezi, se detectó además de CAP (10) y DHC (11), los compuestos 1-2, 3-4, 7, 12, 13, 14, 16, y 17 en estado inmaduro, y en su estado maduro, estos mismos compuestos junto con los compuestos 5, 6 y 8. La determinación de los compuestos 5, 6 y 8 en un estado de madurez posterior puede indicar que o bien se sintetizan más tarde o bien la síntesis es simultánea pero en cantidades no detectables.

Para todas las variedades y en todos los frutos analizados: i) siempre que se detectó al menos un capsicinoides fue CAP (10); ii) siempre que se detectó DHC (11) se detectó CAP (10); iii) siempre que se detectó un capsicinoide minoritario, estaban presentes CAP (10) y DHC (11); iv) los compuestos 1 y 3 sólo aparecieron en la variedad Berezi (Guindillas de Ibarra); y v) los compuestos 9, 15 y 18 sólo aparecieron en la variedad Padrón (Pimiento de Herbón).

En función de los resultados de presencia (1) y ausencia (0) de los distintos capsicinoides se realizó un agrupamiento de las entradas mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). El dendrograma obtenido muestra cinco grupos (Figura 9).

- El grupo I formado por tres subgrupos: i) un subgrupo que recogió el mayor número de entradas no diferenciadas (Bierzo-2, Bierzo-4, Bola-9, Leiva-1; Piquillo-3, Piquillo-5, Piquillo-7, Vera-3, Vera-6 y Vera-8), que tienen en común que sólo se detectó CAP (10) y DHC (11); ii) otro subgrupo formado por las entradas Berezi inmaduro-8 y Bierzo-6, que además de CAP y DHC presentaron el compuesto 7; iii) y el último subgrupo que únicamente se formó por la entrada Arnoia-8, que contenía los compuestos CAP, DHC y el 8.
- El conjunto de muestras pertenecientes al grupo II se caracterizó por tener sólo CAP (10).
- Los grupos III, IV y V reunieron las entradas que contuvieron más de tres capsicinoides. Cabe destacar que los grupos IV y V, compartieron la presencia del compuesto 8, no presente en las entradas del grupo III.

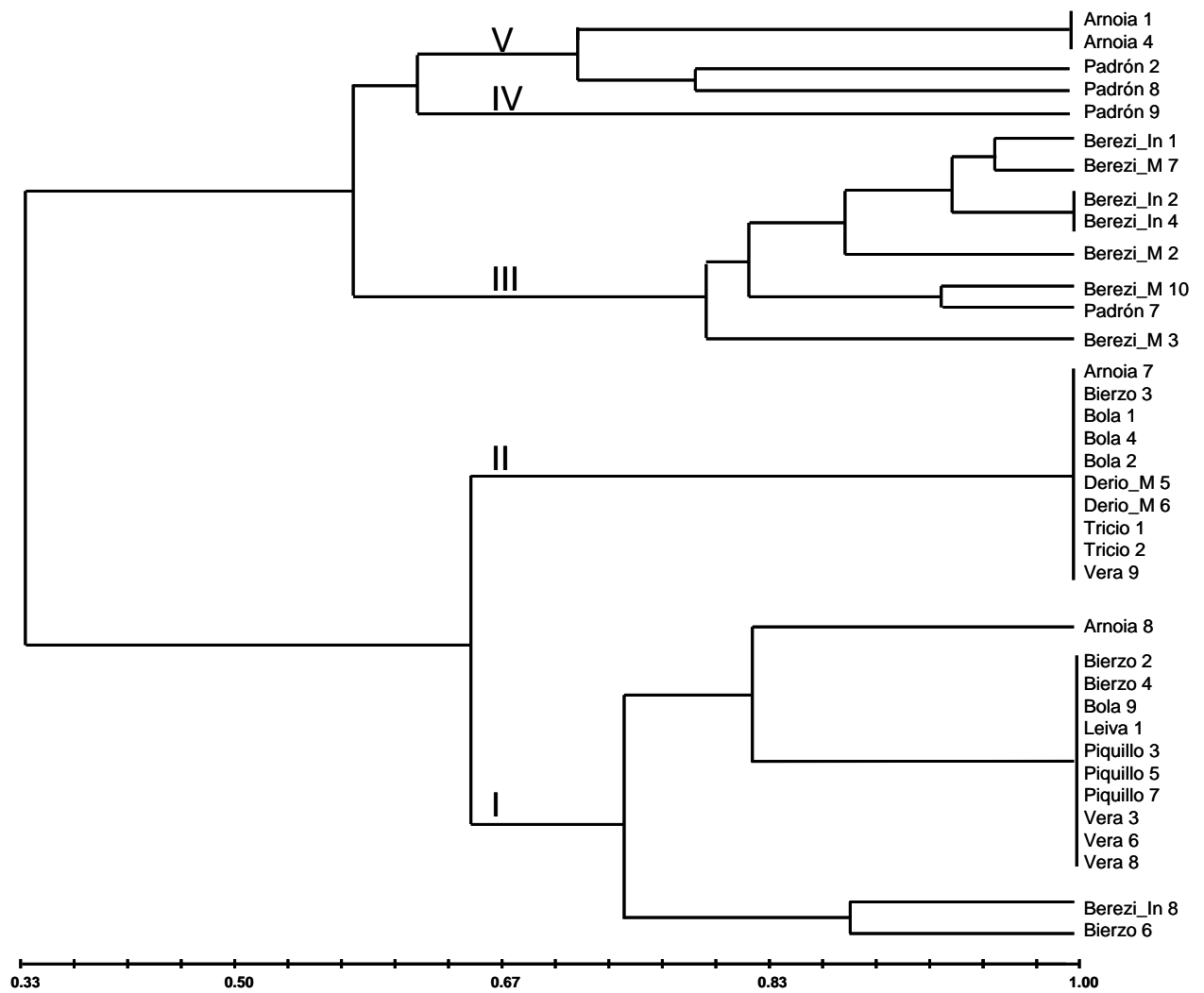


Figura 9: Dendrograma de la similitud de todas las entradas de pimiento analizadas en función de la presencia o ausencia de los distintos capsicinoides detectados

Tabla 9: Perfil de capsicinoides de los distintos frutos de pimiento analizados. (1) 4-ene-6-metil nornorcapsicina, (3) 6-metil nornordihidrocapsicina; (4) N-vainillin octanamida; (5) 4-ene-7-metil norcapsicina; (6) N-vainillin 6-nonenamida; (7) 6-metil nordihidrocapsicina; (8) 7-metil nordihidrocapsicina; (9) N-vainillin nonanamida; (10) 6-ene-8-metil capsicina (capsicina); (11) 8-metil dihidrocapsicina (dihidrocapsicina); (12) N-vainillin decanamida; (13) 6-ene-8-metil homocapsicina; (14) 6-ene-9-metil homocapsicina; (15) N-vainillin 8-undecenamida; (16) 8-metil homodihidrocapsicina; (17) 9-metil homodihidrocapsicina y (18) N-vainillin undecanamida. 1 = Presencia, 0 = Ausencia

	(1) ó (2)	(3) ó (4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
ARNOIA 1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
ARNOIA 4	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
ARNOIA 7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ARNOIA 8	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BEREZI IN 1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
BEREZI IN 2	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
BEREZI IN 4	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
BEREZI IN 8	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
BEREZI M 2	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
BEREZI M 3	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
BEREZI M 7	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
BEREZI M 10	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
BIERZO 2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BIERZO 3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BIERZO 4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BIERZO 6	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BOLA 1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BOLA 4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BOLA 9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
BOLA 2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

	(1) o (2)	(3) o (4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
DERIO M 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
DERIO M 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
DERIO M 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DERIO M 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEIVA 1-	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
LEIVA 2-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PADRÓN 2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
PADRÓN 7	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
PADRÓN 9	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
PADRÓN C8	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
PIQUILLO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PIQUILLO 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PIQUILLO 5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PIQUILLO 7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
TRICIO 1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
TRICIO 2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
VERA 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
VERA 6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
VERA 8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
VERA 9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

4.3 Análisis cuantitativo del contenido de capsicinoides

Dado que sólo se disponen de estándares comerciales de CAP y DHC, únicamente se puede realizar la cuantificación de estos dos compuestos. No obstante, el sumatorio de la concentración de ambos compuestos supone aproximadamente el 90% del contenido total, por lo que este dato es un buen indicador del valor real del picor del fruto.

A partir de las distintas concentraciones de los estándares de CAP y DHC, y de una concentración conocida y siempre constante de SI, se obtuvieron las rectas de regresión que permitieron establecer las ecuaciones necesarias para la cuantificación:

-Para CAP: $Y = 0,5915 X + 0,0122$ ($R^2 = 0,99$)

-Para DHC: $Y = 0,5852 X + 0,3238$ ($R^2 = 0,99$)

Siendo:

Y el valor del [área del capsicinoide x concentración del SI] / área de SI,

y X la concentración (μM).

Los datos del contenido medio de CAP y DHC ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms) para las distintas variedades se muestran en la Figura 10.

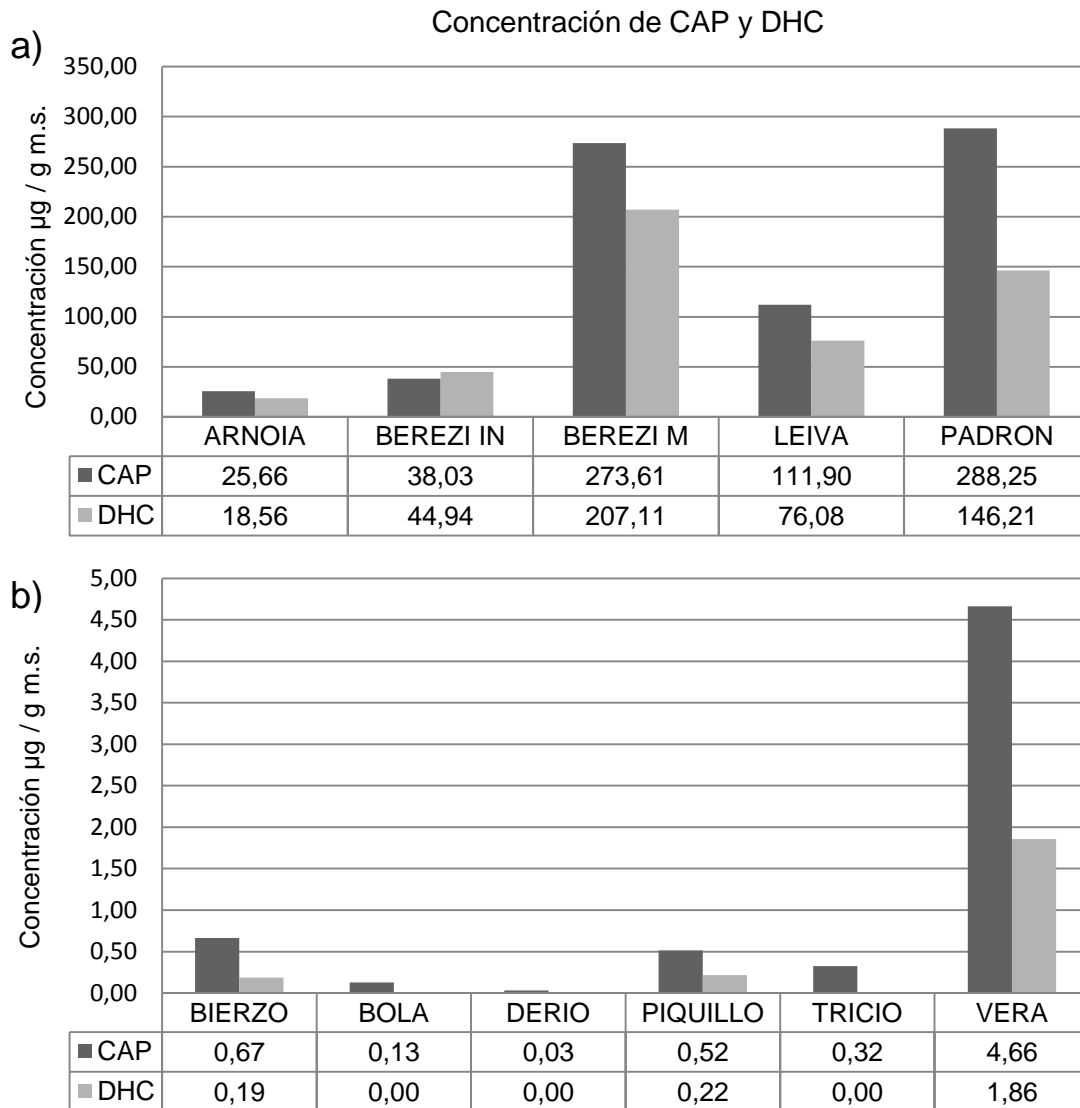


Figura 10: Concentraciones medias de CAP y DHC de las distintas variedades de pimiento analizadas en este trabajo. a) datos de concentración media de CAP y DHC para las variedades más picantes; b) datos de concentración media de CAP y DHC para las variedades menos picantes

Las variedades con mayor concentración media de CAP fueron Padrón y Berezi en estado maduro, presentando valores 228,25 y 273,61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente, las cuales también presentaron contenidos medios mayores de DHC, con valores de 146,21 y 207,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente (Figura 10a). Estos valores están por encima de los valores publicados para la variedad Agridulce (CAP $8,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms y DHC $8,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms) y por debajo de los de la variedad Tabasco (CAP 3785 ± 235 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms y DHC 2461 ± 80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms) (Garcés-Claver et al., 2006). El nivel de picante de Padrón resultó 14 veces inferior al del Tabasco.

Las variedades que tuvieron concentraciones medias más bajas de CAP fueron Derio, Bola y Tricio con 0,03, 0,13 y 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, respectivamente, presentando a la vez valores nulos de contenido medio de DHC (Figura 9b).

La prueba estadística de normalidad de los datos para cada uno de los dos factores, concentración de CAP y DHC, determinó que los datos no presentaban una distribución normal, por lo que fueron transformados $[\log (x+1)]$. Los resultados obtenidos del ANOVA señalaron diferencias significativas para contenido en CAP y DHC, entre y dentro de las distintas variedades (Tabla 10).

Tabla 10: Cuadrados medios para los valores transformados de CAP y DHC de los distintos extractos de frutos analizados.

	CAP		DHC	
	g.l	Cuadrados medios	g.l	Cuadrados medios
Entre variedades	10	25,1953*	7	24,8018*
Dentro de variedades	29	3,08055*	22	4,38625*

*Existen diferencias significativas con un nivel de significación del 95%

Grados de libertad (g.l)

En el ANOVA para concentración de CAP se incluyeron 40 muestras divididas en 11 variedades mientras que para la DHC se incluyeron 30 muestras repartidas en 8 variedades, ya que no en todos los frutos en los que está presente la CAP necesariamente lo está la DHC, como es el caso de las variedades Bola, Tricio y Derio en estado maduro.

En relación a la agrupación de medias, mientras que para el contenido de CAP se establecieron tres grupos, para el contenido de DHC sólo dos (Tabla 11). Si bien la variedad Berezi se dividió en dos submuestras, en función de su estado de maduración, con el fin de determinar diferencias significativas, ambas fueron incluidas en un mismo grupo (*bc* para CAP y *b* en el caso de la DHC). A pesar de que en su estado más avanzado de maduración, se detectaron mayores concentraciones de dichos compuestos y mayor número de compuesto, estas diferencias no llegaron a ser significativas. La variabilidad de estos compuestos en función del estado de desarrollo de fruto ya ha sido previamente descrita en pimientos (Sukrasno et al., 1993).

Las que presentaron una menor concentración media tanto en CAP como DHC fueron las variedades del grupo a. En el análisis para CAP se incluyeron ocho variedades dentro de este grupo, obteniéndose valores medios de concentración entre 0,03 y 111,90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms, mientras que para DHC se incluyeron cinco, obteniéndose valores medios comprendidos desde lo no detectados hasta 76,08 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ms. El rango tan amplio obtenido en estos grupos se debe a la gran variabilidad entre frutos de la misma variedad (Lindsey y Bosland, 1995; Estrada et al., 1998; Zewdie y Bosland, 2000).

Tabla 11: Agrupación de medias para los datos transformados $[\log(x+1)]$ de concentración de CAP y de DHC

Genotipo	CAP	DHC
Bierzo	1,43 \pm 0,88 ¹ a	0,61 \pm 1,05 a
Bola	0,68 \pm 0,88 a	nd ²
Derio Maduro	0,24 \pm 0,88 a	nd
Piquillo	1,48 \pm 0,88 a	0,68 \pm 1,05 a
Tricio	1,26 \pm 1,24 a	nd
Vera	3,25 \pm 0,88 ab	2,11 \pm 1,05 ab
Arnoia	3,53 \pm 0,88 ab	2,87 \pm 1,05 ab
Leiva	3,86 \pm 1,24 abc	3,66 \pm 1,48 ab
Berezi Inmaduro	5,56 \pm 0,88 bc	5,72 \pm 1,05 b
Berezi Maduro	7,16 \pm 0,88 bc	6,73 \pm 1,05 b
Padrón	7,51 \pm 0,88 c	6,59 \pm 1,05 b

¹ Media \pm ES con. ²nd.: no detectado;

Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no muestran diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls.

Para la variedad Leiva no se detectaron diferencias significativas con el resto de grupos. Esto podría deberse a que sólo se incluyeron dos frutos en el análisis (en lugar de cuatro como en la mayoría), siendo además, uno de ellos no picante (valores nulos de CAP y DHC).

Se observó correlación positiva ($R^2 = 96.59\%$) entre el contenido de CAP y el de DHC, es decir, a medida que aumenta la concentración de uno de estos compuestos también aumenta la concentración del otro, esto es debido a que comparten la misma ruta de biosíntesis. Resultados similares fueron encontrados por Blum et al. (2003). Esto implicaría que en un programa de mejora si se seleccionaran entradas con altos contenidos en CAP se seleccionarían también altos contenidos de DHC.

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo han sido:

1. La aplicación de un método de HPLC-ESI-MS/MS(QTOF) ha permitido la detección, con alta selectividad y sensibilidad, de 16 capsicinoides a partir de extractos de frutos de pimiento de variedades comerciales de reconocida calidad diferenciada.
2. Este método analítico ha permitido la identificación de 14 capsicinoides mediante la determinación de la relación de la masa-carga exacta de los iones padres $[M+H]^+$, necesarios para la asignación de la fórmula empírica. Además, los capsicinoides fueron reconfirmados mediante el análisis del patrón de fragmentación de los iones padres.
3. Se han presentado los perfiles de contenido de capsicinoides para los distintos frutos y variedades de pimiento comerciales de reconocida calidad diferenciada, encontrándose variabilidad entre frutos y variedades.
4. Es la primera vez que se presenta información tan precisa sobre la presencia de los distintos metabolitos relacionados con el carácter picante en variedades comerciales de pimiento.
5. La disponibilidad de estándares comerciales de capsicina y dihidrocapsicina ha permitido, mediante la aplicación del método HPLC-ESI-MS/MS(QTOF), la cuantificación de estos dos compuestos con gran fiabilidad y exactitud a partir de extractos de pimiento.
6. La cuantificación de los frutos de las distintas variedades de pimiento utilizadas en este trabajo ha puesto de manifiesto la existencia de variabilidad para el contenido de capsicina y dihidrocapsicina dentro y entre las variedades comerciales analizadas en este trabajo.
7. Las variedades más picantes, Berezi (con distintivo Eusko Label “Guindilla de Ibarra”) y Padrón (reconocida como DOP “Pimiento de Herbón”), contuvieron los perfiles de capsicinoides más amplios.

8. No en todos los casos coincidieron los resultados del carácter picante obtenidos para las distintas variedades con la información disponible que hay de ellas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Andrews J. 1984. En: Peppers, the domesticated *Capsicums*. University Texas Press, pp 170.
- Blum E, Mazourek M, O'Connell MA, Curry J, Thorup T, Liu K, Jahn MM, Paran I. 2003. Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics, 108: 79–86.
- Bristow AWT. 2006. Accurate mass measurement for the determination of elemental formula-a tutorial. Mass Spectrometry Reviews, 25: 99–111.
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW. 1995. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. HortScience, 30: 137–139.
- Contreras-Padilla M, Yahia EM. 1998. Changes in capsaicinoids during development , maturation , and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2075–2079.
- Cooper TH, Guzinski JA, Fisher C. 1991. Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 2253–2256.
- DeWitt D, Bosland PW. 1993. The pepper garden. Ten Speed Press, Berkeley, California.
- Eshbaugh WH. 1979. Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. National Geographic Society Research Reports (USA): 143-162.
- Eshbaugh WH. 1993. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. En: New Crops. Janick J, Simon JE. Eds. Wiley, New York, pp 132-139.
- Eshbaugh WH, Smith PG, Nickrent DL. 1983. *Capsicum tovarii* (Solanaceae), a new species of pepper from Peru. Brittonia, 35: 55-60.
- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA. 1998. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruits development and pungency in “Padrón” peppers. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 73: 493-497.
- Estrada B, Bernal MA, Diaz J, Pomar F, Merino F. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics and peroxidase patterns. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 6234–6239.
- Estrada B, Bernal MA, Diaz J, Pomar F, Merino F. 2002. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1188–1191.
- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K. 1982. Capsaicinoids formation in the protoplast from the placenta of Capsicum fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2591-2592.
- FEPEX (2013). Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas. www.fepex.es

FAOSTAT (2013). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. www.faostat.fao.org

Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés M, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9303–9311.

Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N. 1987. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25: 185-282.

Heiser CB, Smith PG. 1953. The cultivated Capsicum peppers. *Economic Botany*, 7: 214-227.

Hunziker AT. 1950. Estudios sobre *Solanaceae*. I. Sinopsis de las especies silvestres de *Capsicum* de Argentina y Paraguay. *Darwiniana*, 9: 225-247.

Hunziker AT. 1998. Estudios sobre *Solanaceae*. XLVI. Los ajíes silvestres de Argentina (*Capsicum*). *Darwiniana*, 36: 201-203.

Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogous, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2493-2498.

Kim S, et al. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46: 270-278.

Kurita S, Kitagawa E, Kim CH, Momose Y, Iwahashi H. 2002. Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66: 532–536.

Larregla del Palacio S, Llodio I, Maraña A, Riga Sultana P, Elorrieta Arana J, Juaristi Irure B, Abaunza L. 2008. Leuna y Luzea, dos nuevas variedades de pimiento de asar registradas por Neiker-Tecnalia. *Sustrai Revista Agropesquera*, 86: 62-67.

Lejeune MP, Kovacs EM, Westerterp-Plantenga MS. 2003. Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 90: 651-659.

Lindsey K; Bosland PW.1995. A field study of environmental interaction on pungency. *Capsicum Eggplant Newsletter*, 14: 36-38.

MAGRAMA. 2013 Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente www.magrama.gob.es

Maillard MN, Giampaoli P, Richard HMJ. 1997. Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 409-413.

McLeod MJ, Guttman SI, Eshbaugh WH. 1982. Early evolution of chile peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36: 361-386.

- Nuez F, Gil-Ortega R, Costa J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajís. Ediciones Mundi-Prensa, p 607.
- Pénzes I. 1967. A Magyar fűszerpaprika (Hungarian Specie Paprika). Budapest, Akadémiai Kiadó.
- Pickersgill B. 1984. En: Pre-Columbian plant migration, Stone D, Ed., Harvard University Press, Cambridge, MA, pp 105-123.
- Pickersgill B. 1969. En: The domestication of chili peppers. The domestication and exploitation of plants and animal. London University Press, pp 443-450.
- Pickersgill B, Heiser CB, McNeill J. 1979 Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. En: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD, Eds., The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Linnean Society Symposium 7. London: Academic Press, pp 678-700.
- Pozo O, Montes S, Redondo E. 1991. Avances en el estudio de los Recursos Fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo: 217-238.
- Reglamento de la Marca "Ibarrako Piparrak/Guindilla de Ibarra" con Eusko Label. 2013. Hazi (<http://www.euskolabel.net/verdocumento.asp?iddoc=6117>)
- Rodríguez Bao JM, Terrén Poves L, Riveiro Leira M. 2006. Selección de pimientos autóctonos de Galicia. Dossier Galicia 502-505.
- Rodríguez MJ, Garcés-Claver A, Orduna J, Álvarez-Fernández A, Arnedo-Andrés MS. 2010. Análisis del perfil de capsicinoides en germoplasma del *Capsicum* spp. Actas de Horticultura, 55:185-186.
- Rohlf F. 2000. NTSYS PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for the IBM PC Microcomputers (and compatibles), version 2.1 Applied Biostatistics Inc. Stony Brook, New York, USA.
- 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. Analytica Chimica Acta, 557: 236-244.
- Stewart C, Mazourek M, Stellari GM, O'Connell M, Jahn MM. 2007. Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. Journal of experimental botany, 58: 979-991.
- Sukrasno N; Yeoman MM. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. Phytochemistry, 32: 839-844.
- Thompson RQ, Phinney KW, Welch MJ, White VE. 2005a. Reversed-phase liquid chromatography and argentation chromatography of the minor capsaicinoids. Analytical Bioanalytical Chemistry, 381: 1432-1440.
- Thompson RQ, KW, Welch MJ, White VE. 2005b. Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Analytical Bioanalytical Chemistry, 381: 1441-1451.

Walsh BM, Hoot SB. 2001. Phylogenetic relationship of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. *International Journal of Plant Sciences*, 162: 1409-1418.

Zewdie Y, Bosland PW. 2000. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 111: 185-190.

Anexo I – Tiempo de Retención (RT), relación masa-carga exacta de $[M+H]^+$ (m/z), fórmula elemental y error de los capsinoides biosintetizados en un fruto de distintas variedades de pimiento comercial con reconocida calidad diferenciada. Los números entre paréntesis hacen referencia a los compuestos de la Tabla 6

Arnoia 1

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
		(8) RT = 32.7		
294,2047	$C_{17}H_{28}NO_3$	294,2064	1,6	n.d.
122,033	$C_7H_6O_2$	122,0362	3,2	780,2
137,0586	$C_8H_9O_2$	137,0597	1,1	n.d.
158,1538	$C_9H_{20}NO$	158,1539	0,1	n.d.
		(10) RT = 35.1		
306,2095	$C_{18}H_{28}NO_3$	306,2064	-3,1	n.d.
122,0394	$C_7H_6O_2$	122,0364	-3,2	784,5
137,0622	$C_8H_9O_2$	137,0597	-2,5	14,2
153,1311	$C_{10}H_{17}O$	153,1311	-3,7	62,5
182,1622	$C_{11}H_{20}NO$	182,1622	-8,2	70,9
		(11) RT = 49.1		
308,2245	$C_{18}H_{30}NO_3$	308,2220	-2,5	
122,0411	$C_7H_6O_2$	122,0362	-4,9	784,5
137,0613	$C_8H_9O_2$	137,0597	-1,6	31,7
172,1735	$C_{10}H_{22}NO$	172,1696	-3,9	n.d.
184,1707	$C_{11}H_{22}NO$	184,1696	-1,1	n.d.
		(12) RT = 54.1		
308,2184	$C_{18}H_{30}NO_3$	308,2220	3,6	n.d.
		(17) RT = 70.8		
322,2348	$C_{18}H_{32}NO_3$	322,2220	2,9	n.d.

Berezi 1 en estado inmaduro

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
		(1) RT = 21.6		
278,1751	C ₁₆ H ₂₆ NO ₃	278,1751	0	
		(3) RT = 20.3		
280,1917	C ₁₆ H ₂₆ NO ₃	280,1907	-1	
122,0373	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,1	43,8
137,0611	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,4	20,1
144,1393	C ₈ H ₁₈ NO	144,1383	-1	52,1
156,1399	C ₉ H ₁₈ NO	156,1383	-1,6	n.d.
		(7) RT = 30		
294,2061	C ₁₆ H ₂₈ NO ₃	294,2064	0,3	
122,0363	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-0,1	43,8
137,0601	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-0,4	21,4
141,1235	C ₉ H ₁₇ O	141,1274	3,9	n.d.
158,1541	C ₉ H ₂₀ NO	158,1539	-0,1	13,6
170,1555	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	-1,6	n.d.
		(10) RT = 32.3		
306,2063	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	0	
122,0367	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-0,4	14,8
137,0608	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,1	22,7
153,128	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	-0,6	62,5
170,1548	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	-0,9	64,7
182,1551	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	-1,1	70,9
		(11) RT = 44.6		
308,2226	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	0,6	
122,0366	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-0,3	13,1
137,0608	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,1	20,1
155,1405	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1430	2,5	n.d.
172,17	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	-0,4	16
184,1641	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	5,5	n.d.
		(12) RT = 48.7		
308,2237	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-1,6	
122,0373	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,1	784,5
137,0616	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,9	15,4
155,1438	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1430	-0,8	62,5
172,1713	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	-1,7	64,7
184,1815	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	-11,9	n.d.

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
		(13) RT = 46.8		
320,224	C ₁₉ H ₃₀ NO ₃	320,2220	-0,8	
122,038	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,5	784,5
137,061	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,6	11
167,143	C ₁₁ H ₁₉ O	167,1430	-0,3	n.d.
184,173	C ₁₀ H ₂₂ NO	184,1696	-3,2	n.d.
196,17	C ₁₂ H ₂₂ NO	196,1696	-0,5	n.d.
		(14) RT = 47.9		
	C ₁₉ H ₃₀ NO ₃	320,2220		
122,038	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,5	784,5
137,061	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,6	16,6
167,143	C ₁₁ H ₁₉ O	167,1430	-0,3	n.d.
184,173	C ₁₀ H ₂₂ NO	184,1696	-3,2	n.d.
196,17	C ₁₂ H ₂₂ NO	196,1696	-0,5	n.d.
		(16) RT = 66.7		
322,238	C ₁₈ H ₃₂ NO ₃	322,2220	0,1	
122,038	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-2	784,5
137,061	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,3	12,3
169,162	C ₁₁ H ₂₁ O	169,1587	-3,5	n.d.
186,185	C ₁₁ H ₂₄ NO ₂	186,1852	0,8	70,9
198,185	C ₁₂ H ₂₄ NO	198,1852	-0,2	n.d.
		(17) RT = 68.2		
322,238	C ₁₈ H ₃₂ NO ₃	322,2220	0,1	
122,037	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-0,4	11,6
137,06	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-0,3	17,2
169,162	C ₁₁ H ₂₁ O	169,1587	-3,5	n.d.
186,184	C ₁₁ H ₂₄ NO ₂	186,1852	1,2	19,6
198,185	C ₁₂ H ₂₄ NO	198,1852	-0,2	n.d.

Bierzo 6

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
(7) RT = 29.6				
294,2055	C ₁₆ H ₂₈ NO ₃	294,2064	0,9	
122,0331	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	3,1	n.d.
137,057	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	2,7	50
158,1519	C ₉ H ₂₀ NO	158,1539	2	n.d.
(10) RT = 32				
306,2069	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	-0,5	
122,0334	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	2,9	784,5
137,0559	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	3,8	16,2
153,1242	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	3,2	n.d.
170,1517	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	2,2	n.d.
(11) RT = 44.2				
308,2231	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-1,1	
122,0329	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	3,3	784,5
137,0561	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	3,6	15,5
155,1369	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1430	6,1	n.d.
172,1661	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	3,5	64,7
184,17	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	-0,4	n.d.

Bola 9

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
(10) RT = 32				
306,2058	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	0,6	
122,0305	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	5,7	n.d.
137,0599	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-0,2	19,7
153,1228	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	4,6	n.d.
170,1495	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	4,4	n.d.
182,1547	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	-0,8	n.d.
(11) RT = 44.3				
308,2207	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	1,3	
137,0620	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-2,2	780,2
172,1613	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	8,3	n.d.

Leiva 1

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
		(10) RT = 33.6		
306,2115	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	-5,2	
122,0376	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,4	12,5
137,0596	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	0,1	19
153,1271	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	0,3	62,5
182,1549	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	-1	70,9
		(11) RT = 46.7		
308,2250	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-1,1	
122,0361	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	0,2	43,8
137,0582	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	1,5	17,4
155,1383	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1430	4,7	n.d.
172,168	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	1,6	64,7
184,1629	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	6,7	n.d.

Piquillo 1

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
		(10) RT = 35		
306,2075	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	-1,1	
122,0351	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	1,2	784,5
137,0560	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	3,7	24,9
153,1272	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	0,2	n.d.
182,1256	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	1,3	n.d.
		(11) RT = 49		
308,2250	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	4,8	

Padrón 9

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
(6) RT = 26.1				
292,192	C ₁₆ H ₂₆ NO ₃	292,1907	-1,3	
(8) RT = 32.7				
294,2091	C ₁₆ H ₂₈ NO ₃	294,2064	-2,8	
122,0368	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-0,5	784,5
137,0594	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	0,3	19,8
158,1537	C ₉ H ₂₀ NO	158,1539	0,2	58,4
170,1474	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	6,5	n.d.
(9) RT = 35.3				
294,2081	C ₁₆ H ₂₈ NO ₃	294,2064	-1,8	
(10) RT = 35.2				
306,2099	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	-3,5	
122,0377	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,4	11,4
137,0603	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-0,6	18,2
153,1289	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	-1,6	62,5
170,1558	C ₁₀ H ₂₀ NO	170,1539	-1,9	n.d.
182,1535	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	0,5	70,9
(11) RT = 49.1				
308,2248	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-2,8	17,8
122,0374	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-1,1	784,5
137,0601	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-0,4	15,9
155,1402	C ₁₀ H ₁₉ O	155,1430	2,8	n.d.
172,1712	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	-1,6	64,7
184,165	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	4,6	n.d.
(12) RT = 54				
308,2225	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-0,5	
122,0388	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-2,6	784,5
137,061	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-1,3	24,9
155,1401	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	2,9	n.d.
172,1673	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	2,3	n.d.
(14) RT = 51.7				
320,2217	C ₁₉ H ₃₀ NO ₃	320,2220	0,4	

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
(15) RT = 53.2				
320,2223	C ₁₉ H ₃₀ NO ₃	320,2220	-0,3	
122,0361	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	0,1	784,5
137,0591	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	0,6	19,1
184,1737	C ₁₀ H ₂₂ NO	184,1696	-4,1	n.d.
196,1716	C ₁₂ H ₂₂ NO	196,1696	-2	n.d.
(17) RT = 69.6				
322,2359	C ₁₈ H ₃₂ NO ₃	322,2220	1,7	
(18) RT = 70.7				
322,2375	C ₁₈ H ₃₂ NO ₃	322,2220	0,1	
122,0359	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	0,3	784,5
137,0591	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	0,6	12,5
186,186	C ₁₁ H ₂₄ NO ₂	186,1852	-0,7	70,9

Vera 3

Measured	Elemental	Calculated	Error	mSigma
m/z	formula	m/z	(mDa)	Fit value
(10) RT = 35.5				
306,2092	C ₁₈ H ₂₈ NO ₃	306,2064	-2,8	
122,0421	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-5,8	784,5
137,0664	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-6,7	11,3
153,1299	C ₁₀ H ₁₇ O	153,1274	-2,5	n.d.
170,1552	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170,1301	-1,3	n.d.
182,151	C ₁₁ H ₂₀ NO	182,1539	2,9	n.d.
(11) RT = 49.6				
308,2241	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	308,2220	-2,1	
122,0400	C ₇ H ₆ O ₂	122,0362	-3,8	784,5
137,0657	C ₈ H ₉ O ₂	137,0597	-6	31,3
172,1739	C ₁₀ H ₂₂ NO	172,1696	-4,3	64,7
184,1712	C ₁₁ H ₂₂ NO	184,1696	-1,6	n.d.