

## Nota científica

# ESTUDIO DEL PERICARPIO DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Scientific Note

STUDY OF THE PERICARP OF HABANERO CHILI PEPPER (*Capsicum chinense* Jacq.) BY RAMAN SPECTROSCOPY

Luis Zamora-Peredo<sup>1\*</sup>, Rebeca Rodríguez-Jimenez<sup>2</sup>, Leandro García González<sup>1</sup>, Julián Hernández Torres<sup>1</sup>, y Teresa Hernandez Quiroz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana, Adolfo Ruiz Cortines # 455, Fracc. Costa Verde, C.P. 94294, Boca del Río, Veracruz, México.

<sup>2</sup> Ingeniería Química, Universidad Veracruzana, Adolfo Ruiz Cortines # 455, Fracc. Costa Verde, C.P. 94294, Boca del Río, Veracruz, México.

\* Autor de correspondencia E-mail: luiszamora@uv.mx

## RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados experimentales del estudio del pericarpio de frutos inmaduros y maduros de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), de las variedades Mayan Kisin, Mayan Ek y Mayan Kiin, mediante la técnica de espectroscopía Raman. En su etapa inmadura, los frutos de las tres variedades presentaron un color verde, mientras que en su etapa madura los frutos fueron de color amarillo (Mayan Kiin), naranja (Mayan Ek), y rojo (Mayan Kisin). En el espectro Raman de los frutos inmaduros se observó dominio de las señales originadas por clorofila *a* y bacterioclorofila *a*, lo que es característico de su etapa inmadura y su color verde. En los espectros Raman de los frutos maduros se observaron tres picos ampliamente dominantes en 1520, 1154 y 1006 cm<sup>-1</sup>, asociados con los modos vibracionales de los enlaces C=C, C-C y C-CH<sub>3</sub> ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$  y  $\nu_4$ , respectivamente) de los carotenoides, principales responsables del color. Además, es posible observar los picos de los armónicos  $2\nu_1$ ,  $2\nu_2$  y  $2\nu_4$ , y las combinaciones  $\nu_1 + \nu_2$ ,  $\nu_2 + \nu_4$  y  $\nu_1 + \nu_4$ . Mediante un estudio transversal del pericarpio fue posible identificar que los picos en 2857 y 2908 cm<sup>-1</sup> asociados a la vibración simétrica y antisimétrica de los enlaces C-H<sub>2</sub>, respectivamente, son originados por la cutina del fruto. Con este estudio se presenta a la técnica de espectroscópica Raman como un herramienta no destructiva, rápida y muy útil para el estudio del proceso de maduración del habanero.

**Palabras clave:** chile habanero, *Capsicum chinense*, carotenoides, clorofila, espectroscopía Raman.

## ABSTRACT

This work presents the experimental results of the study of the pericarp of unripe and ripe fruits of different varieties of habanero chili peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) - Mayan Kisin, Mayan Ek and Mayan Kiin - using Raman spectroscopy. The unripe fruits of the three varieties were green, but they turned different colors at maturity: yellow (Mayan Kiin), orange (Mayan Ek) and red (Mayan Kisin). The Raman spectrum of the unripe fruit showed the presence of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a*, which are responsible for the green color observed during the immature stage. Raman spectra of ripe fruits revealed the presence of three widely dominant peaks at 1520, 1154 and 1006 cm<sup>-1</sup> associated with the vibrations modes of the bonds C=C, C-C and C-CH<sub>3</sub> ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$  and  $\nu_4$ , respectively) of carotenoids, which are primarily responsible for the color of fruits. In addition, it

is also possible to see the harmonic peaks  $2\nu_1$ ,  $2\nu_2$  and  $2\nu_4$ , and the combinations  $\nu_1 + \nu_2$ ,  $\nu_2 + \nu_4$  and  $\nu_1 + \nu_4$ . The study of the pepper pericarp allowed identifying that the cuticle fruit originates C-H<sub>2</sub> symmetric and asymmetric peaks at 2857 and 2908 cm<sup>-1</sup>, respectively. This study suggests the Raman spectroscopic technique as a non-destructive, fast and useful tool to study the ripening process of habanero pepper.

**Key words:** habanero pepper, *Capsicum chinense*, carotenoids, chlorophyll, Raman spectroscopy.

## INTRODUCCION

El género *Capsicum* ha sido ampliamente estudiado debido a que sus frutos son una fuente rica en capsaicinoides y además cuando el fruto está maduro su pericarpio contiene altas concentraciones de carotenoides. Cuando el fruto está inmaduro el color de su pericarpio es verde y tiene alta concentración de clorofila; a medida que madura, la concentración de los carotenoides aumenta y el contenido de clorofila baja (Ignat et al., 2013; Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013). Los carotenoides en las plantas ayudan a la clorofila para el aprovechamiento de la luz y actúan como protectores de la foto-oxidación. Los animales y humanos no pueden sintetizarlos, pero sí pueden obtenerlos de la ingesta de vegetales y frutas, por lo que el consumo de estos frutos es recomendable para aprovechar sus beneficios, tales como propiedades antioxidantes, fuente de vitamina A y prevención de enfermedades como el cáncer (Kim et al., 2009). Por estas razones el género *Capsicum* tiene mucha demanda en la industria de alimentos, medicinas, pinturas, entre otras.

Diversos estudios se han realizado sobre la concentración de carotenoides en el pericarpio de chiles, principalmente mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (Sun-Hwa et al., 2007; Rodríguez-Uribe et al., 2012; Kilcrease et al., 2013; Giuffrida et al., 2013), en los cuales se han estudiado frutos de diversas especies y con distintos colores en su etapa madura. En general, se observa que cuando el fruto es de color amarillo se espera mayor contenido de luteína, cuando es de color naranja se espera capsantina y zeaxantina, y para los colores rojos los que dominan son la capsantina y la capsorrubina (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013).

Por otra parte, la espectroscopía Raman es una herramienta ampliamente utilizada en el estudio de una gran variedad de materiales, debido a que es una técnica rápida, no-destructiva y que no necesita preparación de la muestra. En la rama de la fitotecnología, la espectroscopía Raman se ha utilizado para el estudio de plantas (Withnall et al., 2003; Baranski et al., 2005; Schulz et al., 2005; Baranska et al., 2013), frutas (Prinsloo et al., 2004; López-Sánchez et al., 2010; Szymańska-Chargot et al., 2011; Trebolazabala et al., 2013) y vegetales

(Bhosale et al., 2004; De Nardo et al., 2009; Killeen et al., 2013; Qin et al., 2011), entre otros. En cuanto al género *Capsicum*, se han reportado diversos estudios con espectroscopía Raman, en donde los espectros son ampliamente influidos por el contenido de los carotenoides (Withnall et al., 2003; Schulz et al., 2005; De Oliveira et al., 2010). El espectro Raman característico del *Capsicum* es dominado por la presencia de 3 picos característicos muy intensos, originados por los modos vibracionales de los enlaces C=C ( $\nu_1$ ), C-C ( $\nu_2$ ) y C-CH<sub>3</sub> ( $\nu_4$ ) de los carotenoides, localizados alrededor de 1517, 1158 y 1004 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

En general, es difícil determinar con exactitud el tipo de carotenoide a partir de los tres modos de vibración, ya que se ha reportado que dichos valores pueden ser afectados por tres factores: principalmente la cantidad de enlaces dobles conjugados de carbono-carbono que existen en la cadena principal de los carotenoides (Withnall et al., 2003), del grupo cíclico terminal en la cadena del polieno, y de los compuestos que rodean a los carotenoides (Schulz et al., 2005; Baranska et al., 2013, De Oliveira et al., 2010). Sin embargo, es de mucha utilidad para estudiar la relación de concentración de carotenoides con otros constituyentes, como puede ser la clorofila.

Aunque la técnica de espectroscopía Raman ya se ha utilizado para el estudio de otras especies de chiles (*Capsicum* sp.), existen pocos estudios enfocados exclusivamente a la especie *Capsicum chinense* Jacq. Además, no se han reportado estudios en diferentes etapas de maduración. En este trabajo se presenta el estudio Raman del pericarpio de tres variedades de chile habanero, que en su etapa madura presentan color amarillo, naranja o rojo, con la finalidad de identificar la clorofila en su etapa inmadura y los cambios de composición que su pericarpio sufre en el proceso de maduración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron frutos de habanero de tres variedades de chile: Mayan Kisin, Mayan Ek y Mayan Kiin, las cuales en su etapa madura son de color amarillo, naranja y rojo, respectivamente, cosechados en la región sureste de México, en la zona central del estado de Veracruz; se cultivaron a cie-

lo abierto, a una altitud aproximada de 500 msnm y a una temperatura promedio de 25°C. Los frutos inmaduros fueron cortados aproximadamente a los 70 días de su plantación, y los maduros a los 85. Las mediciones Raman fueron realizadas en un microscopio confocal (Thermo Scientific, modelo DXR, Madison, Estados Unidos) equipado con un láser de emisión en 532 nm y 10 mW de potencia. Se utilizó un tiempo de colección de 5 s y 30 exposiciones. Se cortaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> y se estudiaron bajo dos configuraciones: Modo A: el láser incide de manera perpendicular a la superficie del habanero, y Modo B: el láser incide de manera paralela a la superficie del habanero. Con esta configuración fue posible estudiar el endocarpio y el mesocarpio, sin la contribución del exocarpio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La Fig. 1 muestra los espectros Raman del pericarpio del habanero amarillo (línea negra), naranja (línea gris punteada) y rojo (línea roja), comparados con el espectro Raman de un fruto inmaduro (línea verde). En 1005, 1154 y 1520 cm<sup>-1</sup> se observan los tres picos asociados a los enlaces

C=C ( $\nu_1$ ), C-C ( $\nu_2$ ) y C-CH<sub>3</sub> ( $\nu_4$ ) de los carotenoides, ya comentados previamente. Entre 2000 y 3100 cm<sup>-1</sup> se observan 8 picos etiquetados como P1, P2, ... P8, algunos de ellos son identificados como los armónicos de los modos fundamentales, es decir son combinaciones lineales de  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  y  $\nu_4$ . De acuerdo a los estudios teóricos y experimentales reportados (Tommasini et al., 2014), estos armónicos pueden ser definidos como:  $P_1 = 2 \nu_4$ ,  $P_2 = \nu_4 + \nu_4$ ,  $P_3 = 2\nu_1$ ,  $P_4 = \nu_1 + \nu_4$ ,  $P_5 = \nu_1 + \nu_2$  y  $P_8 = 2\nu_1$ . Los picos P6 y P7, localizados alrededor de 2857 y 2908 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, presentaron intensidades con muy ligera variación entre los espectros del habanero inmaduro y los frutos maduros, lo que significa que estas señales son originadas por algo que no sufre variaciones en el proceso de maduración (no es el caso de la clorofila ni de los carotenoides).

La Fig. 2 muestra la comparación de los espectros Raman del pericarpio de un fruto inmaduro y de uno maduro de color rojo, entre 800 y 1800 cm<sup>-1</sup>. Se normalizaron todos los espectros con respecto al pico P7, considerando que dicha señal no sufre variación, y para una mejor comparación de las señales se utilizó una escala para cada espectro. En el espectro del fruto inmaduro se obser-

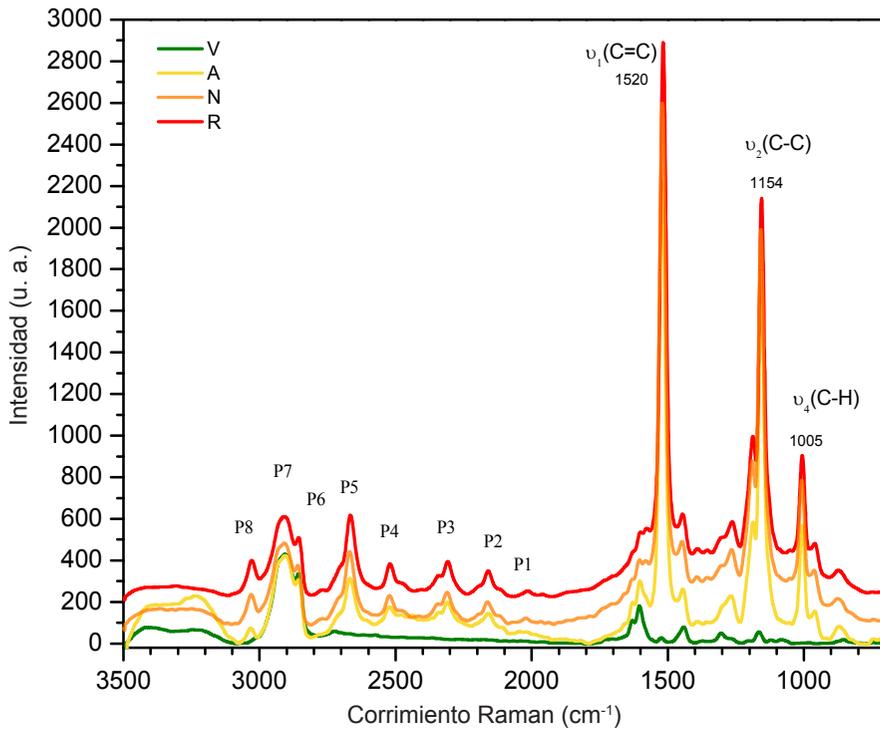


Fig. 1. Espectros Raman de habaneros maduros de color amarillo (A), naranja (N) y rojo (R), comparados con el de un fruto inmaduro verde (V).

Fig. 1. Raman spectra of ripe habanero peppers of different color : yellow (A), orange (N) and red (R), compare to the spectrum of unripe green fruit (V).

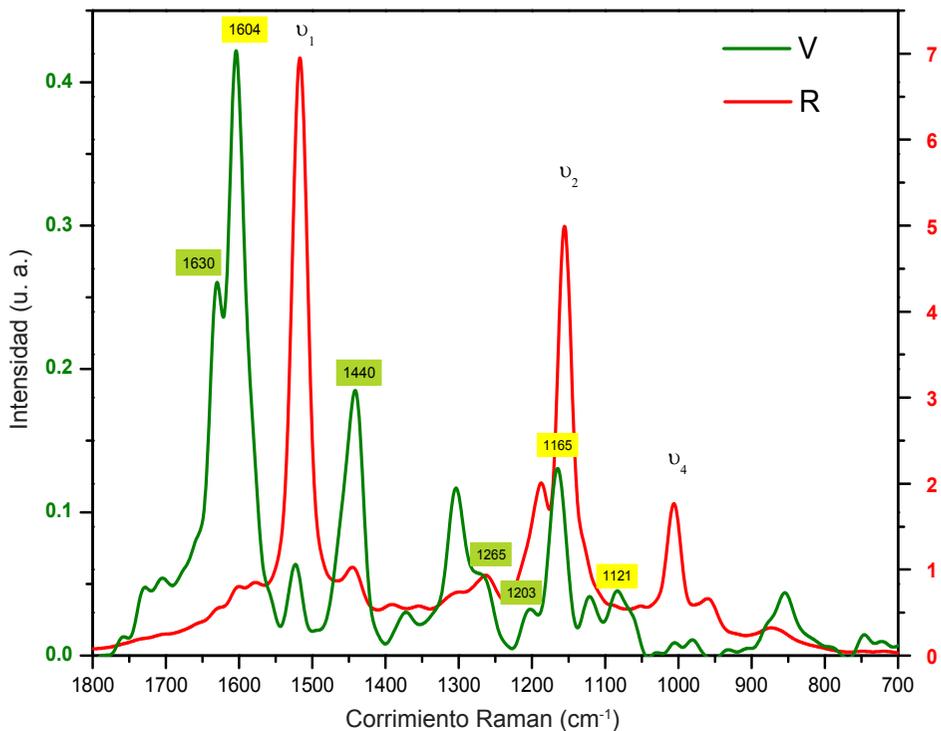


Fig. 2. Comparación de los espectros Raman de un fruto inmaduro (V) y uno maduro (R) de habanero rojo var. Mayan Kisin. La escala vertical de la izquierda es para el espectro del fruto inmaduro y la de la derecha para el fruto maduro.

Fig. 2. Comparison of the Raman spectra of unripe (V) and ripe (R) fruit of red habanero cv. Mayan Kisin. The scale on the left is for the spectrum of unripe fruit, while the scale on right is for the spectrum of ripe fruit.

van picos en 1203, 1265, 1440 y 1630  $\text{cm}^{-1}$ , que son asociados a los modos vibracionales originados por la clorofila *a* (etiquetas sombreadas de verde) y tres señales más (etiquetas amarillas) en 1121, 1165 y 1604  $\text{cm}^{-1}$  asociadas a la bacterio-clorofila *a* (Lutz, 1974; Ceccarelli et al., 2000; Zheng-Li et al., 2002). En el espectro del habanero rojo se observan solo cuatro picos en 1006, 1187, 1155 y 1516  $\text{cm}^{-1}$  asociados a los carotenoides, principalmente. Considerando el cambio de intensidad entre los espectros de frutos maduros y el del inmaduro, es fácil concluir que la concentración de carotenoides en la etapa inmadura es prácticamente nula, por lo que el espectro Raman es dominado por señales originadas por clorofila *a* y bacterioclorofila *a*, y que se maximiza cuando el fruto está en su etapa madura, lo cual tiene congruencia con lo que Ignat et al. (2013) observaron en sus estudios de pimiento morrón (*Capsicum annuum*) con la técnica de espectrometría infrarroja de onda corta. La Fig. 3 muestra el estudio Raman realizado a un fruto inmaduro de la variedad Mayan Kisin, el cual en su etapa madura era de color amarillo, durante un periodo de 12 días después de ha-

berse cosechado. Se observó que aun cuando el fruto fue cosechado en su etapa inmadura (color verde), la concentración de carotenoides va incrementándose, y después de los 12 días su cambio de coloración fue más evidente, justo cuando el espectro Raman es dominado por las señales originadas por los carotenoides. Lo anterior deja claro que mediante la espectroscopía Raman, es posible monitorear la concentración de carotenoides del chile habanero durante su proceso de maduración. Considerando que existen en el mercado muchos modelos de equipos portátiles, esta técnica podría ser una herramienta importante que puede ser utilizada en los campos de cultivo para determinar el tiempo óptimo de cosecha.

Finalmente, la Fig. 4 muestra la comparación de los espectros Raman de un fruto maduro de color naranja obtenido por dos configuraciones diferentes. En el modo A, donde el láser incide de manera perpendicular a la superficie del habanero incidiendo primero en el exocarpio (exterior) y el Modo B, en el cual el láser incide de manera paralela a la superficie del habanero. Con el modo B fue posible estudiar el endocarpio y el

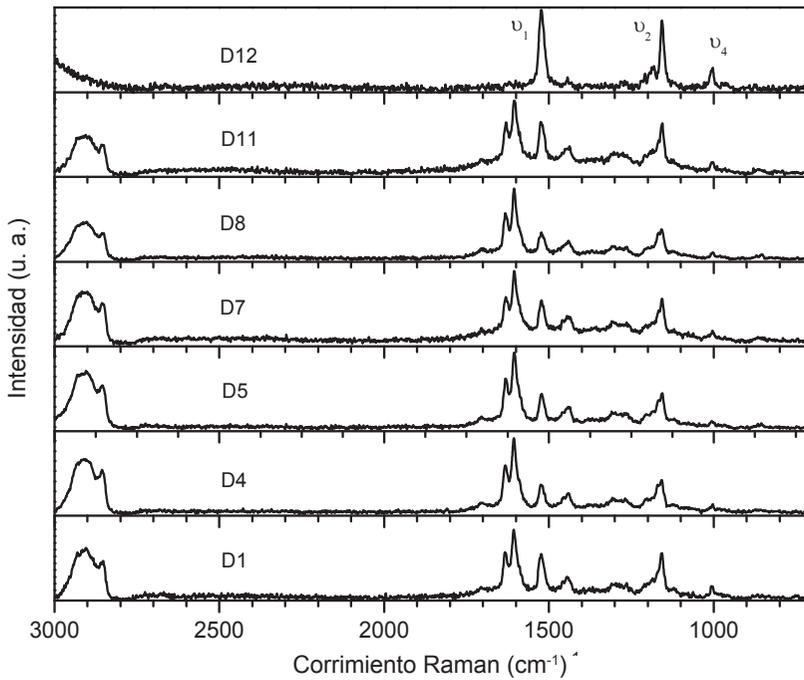


Fig. 3. Evolución de los espectros Raman de un fruto inmaduro de habanero amarillo (Mayan Kiin) durante 12 días.

Fig. 3. Evolution of the Raman spectra of an unripe yellow habanero pepper during 12 days (Mayan Kiin).

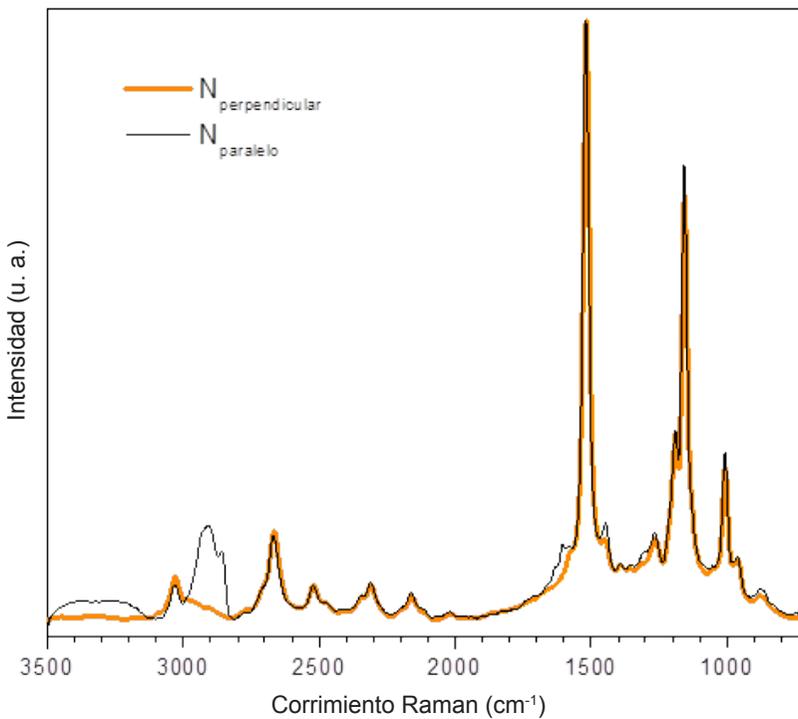


Fig. 4. Comparación de los espectros Raman del pericarpio del habanero de color naranja (Mayan Ek) obtenidos con el láser incidiendo perpendicular (negra) y paralelo (naranja) a la superficie del habanero.

Fig. 4. Comparison of the Raman spectra of the pericarp of orange habanero pepper (Mayan Ek) obtained at normal laser incidence (black) and parallel laser incidence (orange).

mesocarpio, sin la contribución del exocarpio. Se puede observar claramente que los picos localizados en 2857 y 2908  $\text{cm}^{-1}$  desaparecen cuando el láser incide paralelo a la superficie del habanero, sobre la región del mesocarpio, debido a que con esta configuración se evita la contribución de la cutina del fruto, que no es otra cosa más que una capa superficial de cera transparente que ayuda a controlar la evaporación del agua que contiene el fruto. Esta capa superficial y externa es una mezcla de polisacáridos, ácidos grasos esterizados y compuestos alifáticos (Parsons et al., 2013). Estas dos señales ya han sido estudiadas y asociadas a la cutina mediante espectroscopía infrarroja y Raman por otros autores en frutos de olivo (Lopez-Sanchez et al., 2010) y tomate (Heredia-Guerrero et al., 2014).

### CONCLUSIONES

Se observó que cuando los frutos están inmaduros los espectros Raman son dominados por señales originadas por la clorofila *a* y bacterioclorofila *a*, mientras que cuando el fruto está maduro los espectros Raman presentan tres picos muy intensos originados por los carotenoides responsables del color de los frutos. Además, se identificaron dos picos Raman que son originados por la cutina del fruto. Con este estudio, se amplía el conocimiento técnico que se tiene sobre el chile habanero y se presenta la técnica de espectroscopía Raman como una herramienta muy útil para el estudio de productos agrícolas.

### LITERATURA CITADA

- Baranski R., M. Baranska, and H. Schulz. 2005. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta* 222:448-457.
- Baranska M., M. Roman, J.C. Dobrowolskib, H. Schulz, and R. Baranski. 2013. Recent advances in Raman analysis of plants: alkaloids, carotenoids, and polyacetylenes. *Curr. Anal. Chem.* 9:108-127.
- Bhosale P., I. V. Ermakov, M.R. Ermakova, W. Gellermann, and P.S. Bernstein. 2004. Resonance Raman quantification of nutritionally important carotenoids in fruits, vegetables, and their juices in comparison to high-pressure liquid chromatography analysis. *J. Agr. Food Chem.* 52:3281-3285.
- Ceccarelli M., M. Lutz, and M. Marchi. 2000. A density functional normal mode calculation of a bacteriochlorophyll *a* derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 122:3532-3533.
- De Nardo T., C. Shiroma-Kian, Y. Halim, D. Francis, and L.E. Rodriguez-Saona. 2009. Rapid and simultaneous determination of lycopene and  $\beta$ -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57:1105-1112.
- De Oliveira V.E., H.V. Castro, H.G.M. Edwards, and L.F.C. de Oliveira. 2010. Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. *J. Raman Spectros.* 41:642-650.
- Giuffrida D., P. Dugo, G. Torre, C. Bignardi, A. Cavazza, C. Corradini, and G. Dugo. 2013. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 140:794-802.
- Gómez-García M.R., and N. Ochoa-Alejo. 2013. Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *Int. J. Mol. Sci.* 14:19025-19053.
- Heredia-Guerrero J.A., J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, et al. 2014. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. in Plant Sci.* 5:305. doi: 10.3389/fpls.2014.00305.
- Ignat T., Z. Schmilovitch, J. Fefoldi, N. Bernstein, B. Steiner, H. Egozi, and A. Hoffman. 2013. Nonlinear methods for estimation of maturity stage, total chlorophyll, and carotenoid content in intact bell peppers. *Biosystems Eng.* 114:414-425.
- Kilcrease J., A.M. Collins, R.D. Richins, J.A. Timlin, and M.A. O'Connell. 2013. Multiple microscopic approaches demonstrate linkage between chromoplast architecture and carotenoid composition in diverse *Capsicum annuum* fruit. *Plant J.* 76:1074-1083.
- Killeen D.P., C.E. Sansom, R.E. Lill, J.R. Eason, K.C. Gordon, and N.B. Perry. 2013. Quantitative Raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. *J. Agric. Food Chem.* 61:2701-2708.
- Kim S., T.Y. Ha, and I.K. Hwang. 2009. Analysis, bioavailability, and potential healthy effects of capsanthin, natural red pigment from *Capsicum* spp. *Food Rev. Int.* 25:198-213.
- López-Sánchez M., J.M. Ayora-cañada, and A. Molina-Diaz. 2010. Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 58:82-87.
- Lutz, M. 1974. Resonance Raman spectra of chlorophyll in solution. *J. Raman Spectros.* 2:497-516.

- Parsons E.P., S. Popopvsky, G.T. Lohrey, S. Alkai-Tuvia, Y. Perzelan, P. Bosland, et al. 2013. Fruit cuticle lipid composition and water loss in a diverse collection of pepper (*Capsicum*). *Physiol. Plant.* 149:160-174.
- Prinsloo L.C., W.D. Plooy, and C. van der Merwe. 2004. Raman spectroscopic study of the epicuticular wax layer of mature mango (*Mangifera indica*) fruit. *J. Raman Spectros.* 35:561-567.
- Qin J., K. Chao, and S.K. Kim. 2011. Investigation of Raman chemical imaging for detection of lycopene changes in tomatoes during post-harvest ripening. *J. Food Eng.* 107:277-288.
- Rodriguez-Uribe L., I. Guzman, W. Rajapakse, R.D. Richins, and M.A. O'Connell. 2012. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. *J. Exp. Bot.* 63:517-526.
- Schulz H., M. Baranska, and R. Baranski. 2005. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers* 77:212-221.
- Sun-Hwa H., K. Jung-Bong, P. Jong-Sug, L. Shin-Woo, and C. Kang-Jin. 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *J. Exp. Bot.* 58:3135-3144.
- Szymańska-Chargot M., J. Cybulska, and A. Zdunek. 2011. Sensing the structural differences in cellulose from apple and bacterial cell wall materials by Raman and FT-IR spectroscopy. *Sensors (Basel)* 11:5543-5560.
- Tommasini M., G. Longhi, S. Abbatec, and G. Zerbina. 2014. Theoretical investigation and computational evaluation of overtone and combination features in resonance Raman spectra of polyenes and carotenoids. *J. Raman Spectros.* 45:89-96.
- Trebolazabala J., M. Maguregui, H. Morillas, A. de Diego, y J. M. Madariaga. 2013. Use of portable devices and confocal Raman spectrometers at different wavelength to obtain the spectral information of the main organic components in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 105:391-399.
- Withnall R., B.Z. Chowdhry, J. Silver, H.G.M. Edwards, and L.F.C. de Oliveira. 2003. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim. Acta Mol. Spectros.* 59:2207-2212.
- Zheng-Li C., H. Zeng, M. Chen, and A.W.D. Larkum. 2002. Raman spectroscopy of chlorophyll d from *Acaryochloris marina*. *Biochem. Biophys. Acta Bioenerg.* 1556:89-91.