

4. AVANCES EN LA AUTENTIFICACIÓN DEL PIMENTÓN DE LA VERA

*M^a de Guía Córdoba Ramos
Alejandro Hernández León
Teresa de Jesús Bartolomé García*

1. INTRODUCCIÓN

Los historiadores coinciden en señalar que el Nuevo Mundo es el lugar de origen del pimiento (Bosland *et al.*, 1996), y que fue introducido en Europa a través de España por Cristóbal Colón en 1493. Ofrendado a los Reyes Católicos en el Monasterio de Guadalupe, probablemente fueron los monjes Jerónimos de este monasterio los que extendieron el cultivo por cada uno de sus conventos, llegando así al monasterio de Yuste, en la comarca de La Vera (Cáceres) desde donde pasó, entre otros, al monasterio de esta Orden en La Ñora (Murcia), de cuyo nombre proviene la identificación de la cáscara seca de pimiento con el sinónimo de “ñora”. Esto dio lugar, con el paso de los años, a que en España hubiese dos importantes zonas productoras de pimentón, la comarca de La Vera y la Región de Murcia (Zapata *et al.*, 1992).

A pesar de tener un origen común y un desarrollo prácticamente paralelo, el pimentón producido en cada una de estas zonas era absolutamente diferente, la razón: el clima. Las lluvias otoñales, coincidentes con el momento de la cosecha de los frutos, obligaron a desarrollar un proceso alternativo al secado al sol, como se hacía en Murcia, y éste fue el secado al humo.

Este sistema de secado confiere al “*Pimentón de La Vera*” un olor, sabor y aroma inconfundible y una estabilidad del color muy superior a los pimentones obtenidos mediante otros sistemas de secado. Estas características hacen que el pimentón de la Vera sea un producto único en el mundo, en el más estricto sentido de las palabras: hay muchos pimentones en el mundo, pero pimentón ahumado sólo puede encontrarse en esta zona de producción.

Las primeras noticias sobre el cultivo del pimiento en La Vera son muy antiguas. En los “Interrogatorios de la Real Audiencia de Extremadura”, en 1753, se cita el

pimiento entre los cultivos principales en Jaraíz de La Vera y, en los de 1791, se vuelve a mencionar el pimiento entre los frutos principales, junto a las cosechas de aceite, castañas, seda e higos (Serradilla, 1998).

El asentamiento definitivo del cultivo en La Vera tiene lugar a mediados del siglo XVIII, en pequeños bancales en la margen derecha del río Tiétar, en los llamados *linares*, sustituyendo al cultivo del lino. Continuará su expansión durante todo el siglo XIX, hasta convertirse en el cultivo que hará posible la revolución agraria de la comarca de La Vera a finales de siglo, desplazando a dos productos tradicionales que hasta entonces eran básicos en la economía verata, el lino y la seda. La imposibilidad de la industria textil artesanal de la zona para competir con la moderna industria catalana, provocó el abandono de estas producciones. A partir de este momento, los linares se dedicarán al cultivo del pimiento pimentonero, y será éste el que, a partir de principios del siglo XX, transforme la situación económico-social de la comarca.

A principios del siglo XIX La Vera era ya una importante zona de producción de pimentón; así lo confirma el Conde de Canilleros, que al referirse a la Extremadura de 1829, habla del pueblo de Jaraíz de La Vera, como uno de los primeros centros de producción de pimentón (Serradilla, 1998).

Desde los comienzos del cultivo del pimiento hasta el año 1978, la evolución de la superficie de cultivo fue ascendente, alcanzándose en este año el máximo histórico con 3.800 ha. A partir de entonces la superficie dedicada al cultivo empieza a disminuir, descendiendo hasta las 1.000 ha en 1989 (Bartolomé, 1989). Razones de distinta índole justifican este hecho: por un lado la fuerte subida del coste de la mano de obra ocurrida a finales de los años setenta, ya que este cultivo es muy exigente en ella. Por otro lado, la entrada masiva de pimientos secos procedentes de otras zonas del mundo, capaces de producir mucho más barato que los agricultores veratos, proporcionando elevadísimos márgenes de rentabilidad a aquellos industriales que basan su producción en la mezcla de éstos con los pimientos producidos y secados en La Vera al modo tradicional. El principal exportador de pimiento seco empezó siendo Marruecos, si bien, la baja calidad del pimiento marroquí propició las importaciones de países como Sudáfrica y Zimbabue (Bartolomé, 2002). Otros países africanos productores son Mozambique, Zambia y Malawi. Mas recientemente se han incorporado países de Sudamérica, donde destaca principalmente Perú.

En 1987 se importaron en España 400 t de pimientos secos y actualmente rondan las 25.000 t. En el año 2004 el principal país del que España importó pimiento seco fue Perú, con el 65% del total, seguido por Zimbabue y Sudáfrica con el 14 y 9% del total.

La inestable situación política de algunos de estos países ha provocado una disminución de la producción y un incremento de los precios en los últimos tres años. A pesar de eso, a los industriales españoles les sigue resultando interesante por el altísimo rendimiento de color de los pimientos africanos.

Estas circunstancias han hecho variar sustancialmente la situación del sector pimentonero en España, de forma que la superficie de cultivo ha disminuido alarmantemente, tanto en La Vera como en Murcia, pasando de las casi 15.000 ha del año 1970, a las escasas 4.000 ha que desde el año 1996 se vienen cultivando en nuestro país.

En muchos casos, las mezclas hechas con diferentes proporciones de pimientos veratos secados al humo y pimientos de importación se comercializaban como pimentón de La Vera, lo que evidentemente constituía un fraude al consumidor. Las mezclas oca-

sionaron una disminución de la calidad en los embutidos a los que se incorporaban. La preocupación de agricultores e industriales veratos por la situación de un subsector de gran importancia económico social para la Comarca de La Vera, provocó una importante movilización para conseguir de la administración, alguna medida que pudiese garantizar la producción de pimentón verato. Fruto de estos esfuerzos fue la Denominación de Calidad “*Pimentón de La Vera*”, cuyo Reglamento fue aprobado por el Gobierno Autónomo de Extremadura en 1991.

En el año 1994 se dio un paso más en la lucha por mantener y asegurar la calidad del Pimentón de La Vera con la aprobación de la *Denominación de Origen “Pimentón de la Vera”* con carácter provisional, hasta la aprobación de su Reglamento el 21 de mayo de 1998, convirtiéndose entonces en definitiva

Por último, la Denominación de Origen Protegida “Pimentón de La Vera”, cuyo Reglamento ha sido aprobado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación mediante la Orden APA/4.178/2005 de 22 de diciembre (BOE. nº 4, 05-01-2006) y por la Unión Europea (Reglamento CE nº 982/2007 de la Comisión, de 21 de agosto de 2007. DOCE de 22 de agosto de 2007), supone el reconocimiento y protección de este producto en el marco de la UE.

El Reglamento define al “Pimentón de La Vera” como el “producto obtenido de la molienda de frutos totalmente rojos, de la especie *Capsicum annuum* var. *longum* L., de las variedades del grupo de las “Ocales”: Jaranda, Jariza y Jeromín, y de la especie *Capsicum annuum* L. de la variedad Bola, recolectados maduros, sanos, limpios, con el color característico de la variedad, libres de ataques de plagas o enfermedades, secados con leña de encina y/o roble, por el sistema tradicional de La Vera, y que proceda de la zona de producción que se delimita en dicho Reglamento.

El ámbito geográfico de producción comprende 50 términos municipales, distribuidos en la Comarca de La Vera, Campo Arañuelo, Valle del Alagón y Valle del Ambroz, en el Norte de la provincia de Cáceres. Por lo tanto, el “Pimentón de La Vera” habrá de ser producido, secado, molido y envasado en el ámbito geográfico que establece el Reglamento.

Desde la puesta en marcha de la Denominación de Origen Protegida se ha producido un mantenimiento sostenido de la superficie y producción amparada. En el año 2005 se cultivaron bajo esta DOP 920 ha, con una producción de 2,7 millones de kg. Respecto a la industria, 12 están acogidas a la DOP y comercializan más del 98% del pimentón producido en la comarca.

En general, las variedades autorizadas se caracterizan por su gran rusticidad, buena adaptación a la zona, condiciones y época de cultivo y resistencia a las podredumbres. A continuación se describen las variedades autorizadas en el Reglamento de la DOP “Pimentón de La Vera”. Las tres primeras tienen su origen en la Comarca de La Vera y pertenecen al tipo denominado “Ocal” o “Agridulce de La Vera”. La cuarta es la variedad Bola, igualmente autorizada por el Reglamento de la DOP.

- *Jaranda* (*Capsicum annuum* var. *longum*): La planta tiene una altura mediana, con fruto alargado (13,5 x 1,8 cm), de color rojo muy intenso cuando alcanza la madurez, y con ausencia de capsaicina. El fruto tiene un bajo contenido de semillas.
- *Jariza* (*Capsicum annuum* var. *longum*): La planta es de mediana altura, con fruto alargado (15 x 2 cm), de color rojo muy intenso en madurez. El fruto tiene un bajo contenido en semillas.

- *Jeromín (Capsicum annuum var. longum)*: La planta, en este caso es de bajo porte, con fruto alargado, de un color rojo intenso en su madurez. El fruto tiene presencia de capsaicina, lo que le confiere sabor picante.
- *Bola (Capsicum annuum)*: La variedad “Bola” se caracteriza por la obtención de un tipo de pimiento dulce, de poco peso y de forma subesférica. Su pericarpio es semicarnoso, y la cavidad del fruto está dividida en tres compartimentos iguales, separados por tabiques algo carnosos.

2. PROCESO DE ELABORACIÓN DE PIMENTÓN

Este proceso consta de dos fases claramente diferenciadas: el secado del fruto y la molienda de los mismos. El primer paso ha sido y continúa siendo distinto según las regiones, influyendo de forma determinante en el producto final.

En Murcia, donde el clima es seco y cálido, tradicionalmente se realizaba el secado de los pimientos al sol, y aunque aún existen agricultores que continúan esta práctica, la mayor parte del pimiento se seca mediante secaderos industriales. La técnica del *secado al sol* consiste en extender los pimientos enteros sobre eras, bandejas o zarzos de caña y dejarlos expuestos a la acción de los rayos solares durante un periodo comprendido entre 1 y 4 días, hasta que el pimiento se presente blando y arrugado (pansío). Después se abren los pimientos y vuelven a extenderse al sol hasta la completa desecación. La cáscara que se obtiene por secado al sol presenta una humedad total media final de 18% (v/p), de aquí que al tacto sea blanda y ligeramente elástica.

Para deshidratar el pimiento en *secaderos de aire caliente* es necesario realizar dos operaciones previas: el lavado, que suele efectuarse en tambores rotativos con duchas; y el corte del pimiento, que normalmente se hace en tolvas de caída, en donde el pimiento es cortado en tiras de un espesor aproximado a un centímetro. Los secaderos más usados son los de túnel, que son adecuados para productos cuyo tiempo de deshidratación esté comprendido entre 4 y 8 horas, y los secaderos de bandejas, que son más adecuados para productos de secado comprendido entre 2 y 4 horas.

En La Vera el sistema tradicional de deshidratado es el *secado al humo*. Se trata de un proceso lento y laborioso que se lleva a cabo en secaderos de corriente vertical con hogar inferior, en unas construcciones de características muy particulares ubicadas en las mismas parcelas donde tiene lugar el cultivo, encargándose de esta primera fase de transformación el propio agricultor (figura 1).

Una vez recolectado el pimiento es transportado al secadero. Los secaderos son construcciones de dimensiones variables, aunque la mayoría tiene una planta cuadrada (edificios de 4 x 4 m² y 5 m, aproximadamente, de altura). Los materiales generalmente empleados en su construcción son ladrillo y teja árabe. Constan de una planta baja y de una planta superior; en la primera se coloca el hogar de leña de encina y/o roble (figura 1).

FIGURA 1: Imagen del exterior de un secadero de corriente vertical (izquierda), del hogar de leña (centro), y del piso superior donde se cargan los pimientos.



Fuente: Ficheros EPA, series homogéneas. INE

El piso superior es el lugar donde se depositan los frutos introduciéndolos por una ventana o puerta de carga. El suelo de esta planta está formado por un emparillado de madera que permite el paso del aire caliente y los gases de la combustión (humo) procedentes del hogar del piso inferior. La techumbre se hace con teja vana para permitir la salida de los gases de combustión (Bartolomé *et al.*, 1999). Es preciso mantener una temperatura constante, entre 35-45°C, según el momento del secado en que se encuentre el pimiento. Diariamente es necesario el volteo de los frutos para que el secado sea uniforme, operación conocida como “*rodeado*” del pimiento. La capacidad de estos secaderos es de unos 3.200 kg, lo que implica una masa de pimientos de 1 metro de espesor, aproximadamente.

El fruto se deja secar entre diez y quince días. En este tiempo los pimientos pasaran de un 80% de humedad a menos de un 15%. Este lento proceso de secado con humo de leña confiere una adecuada estabilidad del color del pimentón gracias a las bajas temperaturas de secado empleadas (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994; Pérez-Gálvez *et al.*, 2004).

Una vez seco, el agricultor introduce los pimientos en los sacos o costales y los lleva a las industrias pimentoneras, donde se valora su calidad y tiene lugar la molienda en los tradicionales molinos de piedra.

Los agricultores venden los pimientos secos (denominados “*cáscara*” o “*rama*”) a las industrias molineras de la zona, en los que tiene lugar la segunda fase de la transformación que llevará definitivamente, a la obtención del pimentón.

Para la obtención de este polvo rojo, los pimientos secos se muelen según un proceso que incluye los siguientes pasos, aunque no siempre se realizan en su totalidad.

- 1.- Mediante un sistema de martillos y cribas, el fruto es despezonado, es decir desprovisto de pedúnculo.
- 2.- El fruto despezonado pasa a una desbinzadora, donde es desprovisto de las semillas.
- 3.- Posteriormente la cáscara de pimiento pasa a un triturador, y de aquí, mediante una red de sinfines, pasa a la primera fase de la molienda.
- 4.- Este primer paso es realizado en molinos de piedra de esmeril, que básicamente constan de tolva, canaleja, muelas y boca de salida.

El funcionamiento de los molinos se lleva a cabo por dos piedras (muelas) una de ellas fija y la otra móvil, ambas colocadas en vertical, aunque existen molinos en los que las muelas se disponen en posición horizontal. Estas muelas se van aproximando una a la otra, a medida que avanza la molienda por medio de un tornillo denominado “carro”.

Las muelas son piedras de esmeril, material artificial, esmeril, a base de cemento, magnesita y otros que presentan un aspecto muy parecido del granito, y cuyo diámetro es 80 cm.

Los molinos se instalan en batería, de forma que el pimiento puede pasar hasta cinco veces por el mismo molino, si fuese necesario, para conseguir el granulado deseado.

El pimentón así obtenido pasa a la segunda fase de la molienda, en la que se consigue el refinamiento del producto procedente de la primera fase, haciéndolo pasar por las llamadas “piedras de transmitir”, que se disponen en posición horizontal y que funcionan a menos revoluciones que las muelas. El pimentón queda así listo para ser envasado y comercializado.

3. CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE PIMENTÓN

Muchos trabajos técnicos y de investigación han contribuido a profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos del pimentón desde el punto de vista de la calidad, pero muy pocos están centrados en el caso particular del Pimentón de la Vera, y en concreto en estudiar los métodos analíticos posibles para la detección de mezclas de pimientos elaborados con distintos sistemas de secado. Estos trabajos se han basado en el uso de distintas técnicas analíticas como se detalla a continuación.

3.1. Estudio de los componentes del color

El principal factor de calidad del pimentón es su color, ya que del mismo dependerá su valor comercial (Navarro y Costa, 1994). Tradicionalmente, se utilizaba la estimación visual del color como medida para valorar el pimentón; pero este proceso dependía de varios factores, tales como la luz incidente, la naturaleza y granulometría de la muestra, la humedad, el contenido graso, los colores de los objetos de su entorno y, sobre todo, del observador (Little y Mackinney, 1972). Esto hacía que la estimación del color fuese un proceso bastante subjetivo. Actualmente, la medida de éste se efectúa generalmente por la extracción de la pigmentación con un disolvente orgánico, y posterior cuantificación espectrofotométrica. En este sentido, cabe mencionar los trabajos llevados a cabo por Ayuso (1998), basados en el proceso degradativo de carotenoides que ocurre después del procesado del pimentón. Esta degradación es más lenta en los pimentones que se han obtenido mediante el secado lento y al humo, que en aquellos que han seguido otro proceso de deshidratación. Aunque los resultados derivados de estos estudios no son concluyentes.

Por otra parte, dos métodos muy utilizados en la industria para medir el color son American Spice Trade Association (ASTA)-20 y STANDARD, y aunque el valor que

ambos expresan para una misma muestra es diferente, la correlación existente en la medida es muy alta (Salmerón, 1973). Estos métodos, tienen el inconveniente de que no permiten diferenciar pimentones que tengan distinta composición carotenoides y análogo poder colorante. Otra vía de estudio partió de la idea de que, en el pimiento rojo maduro, los pigmentos pudieran estar presentes en unas proporciones relativamente fijas y pueden servir como elementos identificativos de género o variedad. Para este fin, las técnicas cromatográficas se consideran las más adecuadas para diferenciar los pigmentos carotenoides y, dentro de éstas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por ser sensible, rápida y versátil. En la detección de pigmentos del pimentón utilizando técnicas cromatográficas, cabe destacar los trabajos realizados por Mínguez-Mosquera y colaboradores, acerca de la relación entre los pigmentos carotenoides rojos y amarillos en el pimiento pimentonero (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1984). Además, han trabajado en el estudio de la influencia del sistema de procesado del pimentón sobre los principales carotenoides, y más concretamente en el caso de las variedades “Bola” y “Agridulces” (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994). La influencia del sistema de secado también ha sido tratado (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1994). De todos estos estudios se desprende que la composición de carotenoides del pimentón está sujeta a muchos factores, no siendo por lo tanto la mejor matriz para la detección de mezclas fraudulentas de pimentón.

3.2. Técnicas de análisis de perfiles de proteínas

El hecho de que las proteínas sean productos directos de la traducción y transcripción de genes, las convierten en elementos ideales para identificación de variedades de plantas. En la actualidad, existen diversos métodos analíticos para el estudio de los perfiles proteicos, siendo los métodos electroforéticos los más empleados en la diferenciación de las variedades vegetales. A su vez, la electroforesis ha sido desarrollada en geles y en capilares. Dentro de las electroforesis en gel, hay que distinguir entre las no desnaturizantes o nativas y las desnaturizantes. En las primeras, las proteínas se separan por su carga y tamaño o configuración molecular, o bien por su punto isoeléctrico, mientras que en las otras se separan en base exclusivamente al tamaño de sus subunidades.

Una de las primeras técnicas de *electroforesis en gel no desnaturizantes* utilizadas es la electroforesis ácida en gel. Dentro de esta técnica encontramos las variantes de electroforesis en geles de almidón (SGE), empleada corrientemente en la diferenciación de variedades de trigo mediante el estudio de las gliadinas (Wrigley *et al.* 1992). Otra técnica no desnaturizante es el enfoque isoeléctrico (EFI), aun siendo una técnica reconocida por su alto poder resolutivo (Weiss *et al.*, 1991), la complejidad que presenta (por ejemplo la producción de gradientes de pH), la ha relegado respecto a otras electroforesis a aquellos estudios en los que no se puede utilizar otra técnica alternativa.

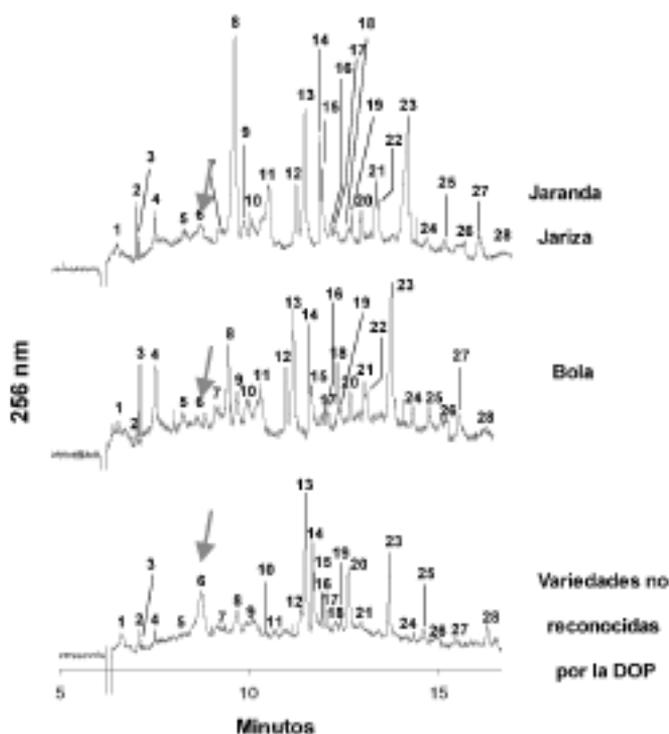
En cuanto a las *electroforesis en geles desnaturizantes* hablaremos de la SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliácridamida con dodecil sulfato sódico). La SDS-PAGE es la técnica más ampliamente utilizada para el estudio de perfiles proteicos mediante electroforesis en gel (Becerra y Paredes, 2000). El uso de la SDS-PAGE se ha mostrado como una herramienta muy útil para la discriminación entre variedades de cul-

tivos como avena y otros cereales (Cooke, 1984; 1988; Smith y Smith, 1992). Además, la SDS-PAGE ha sido utilizada para el estudio de relaciones filogenéticas en el género *Capsicum* L. analizando proteínas de reserva (Srivalli *et al.*, 1999), así como la caracterización de variedades de *Capsicum annum* (Luchese *et al.*, 1999; Anu y Peter, 2003).

Por su parte, el uso de la *electroforesis capilar (ECZ)* presenta claras ventajas con respecto a la técnica en gel, como son análisis rápido, incremento de la eficiencia y la resolución (Manabe, 1999). En particular, en la ECZ se separan especies iónicas, inyectándolas en un capilar relleno de un tampón en base a la diferencia en la movilidad electroforética o a la densidad de la carga. Esta técnica ha sido aplicada con éxito para la resolución de mezclas complejas de proteínas como la diferenciación específica del género *Vicia* (Piergiovanni y Taranto; 2005), para el análisis de mezclas de leche (Molina *et al.*, 1999) o para diferenciar especies de animales destinadas a consumo (Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba, 1997). Además, proteínas de diferentes fracciones de cereales han sido separadas, obteniendo diferentes perfiles proteicos en las fracciones de prolaminas, glutelinas y gliadinas para distintos genotipos de cereales (Yan *et al.*, 1999; Bean *et al.*, 2000).

En el caso concreto de la caracterización de pimentones, la ECZ ha resultado adecuada para la detección de bajos porcentajes de mezcla entre variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera”. Se han estudiado distintas fracciones

GRÁFICO 2: Fracción de proteínas solubles en metanol de pimentones elaborados con variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” analizados mediante ECZ.

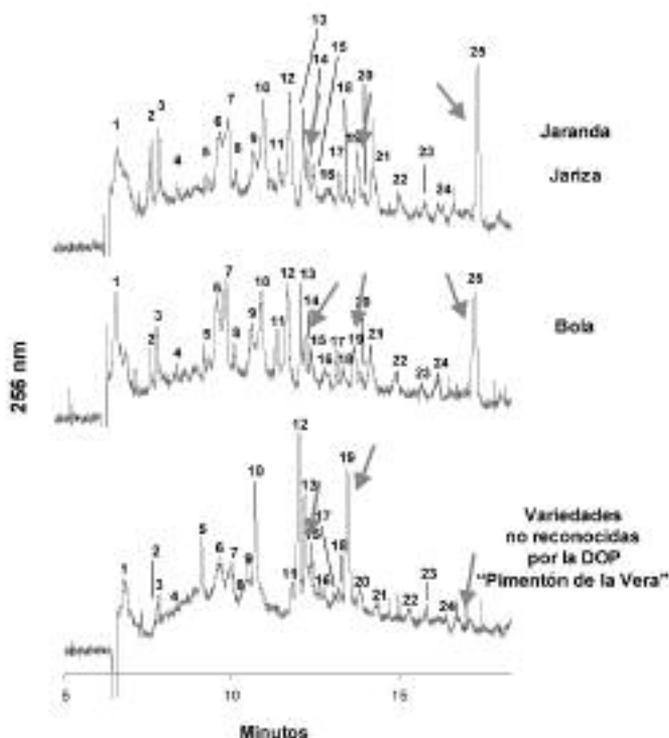


proteicas extraídas de muestras de pimentones elaborados tanto con variedades reconocidas (Jaranda, Jariza y Bola) como no reconocidas (Sonora, PS9794, Papri Ace, Papri Queen y Papri King) por la DOP, y mezclas de ambas (con porcentajes de mezcla de 5, 10, 20, 40 y 60 % de variedad no reconocida).

La fracción de proteínas solubles en metanol, permitió la identificación de mezclas fraudulentas de pimentones a niveles inferiores al 20% en todas las mezclas realizadas, llegando a niveles de detección del 5% para mezclas de pimentones elaborados con la variedad reconocida Bola y con variedades no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” (Hernández *et al.*, 2006). En el gráfico 2 se muestran los electroferogramas de la fracción de proteínas solubles en metanol obtenidos para las diferentes variedades estudiadas. Como se puede observar, el pico 6 presentó un área significativamente mayor en los pimentones elaborados con variedades no reconocidas.

Otras fracciones proteicas con las que se obtuvieron buenos resultados en la detección de mezclas fraudulentas en el Pimentón de la Vera fueron las fracciones hidrófilas e hidrófobas obtenidas mediante partición con la adición del detergente Triton X-114 (Hernández *et al.*, 2007). Mediante el análisis de la fracción hidrofílica se obtuvieron límites de detección de mezclas fraudulentas inferiores al 20% en todos los casos, empleando como diagnóstico los picos 14, 19 y 25 (gráfico 3). Además, el pico 25 aportaba información adicional sobre el tipo de secado que había sufrido el pimiento, sólo

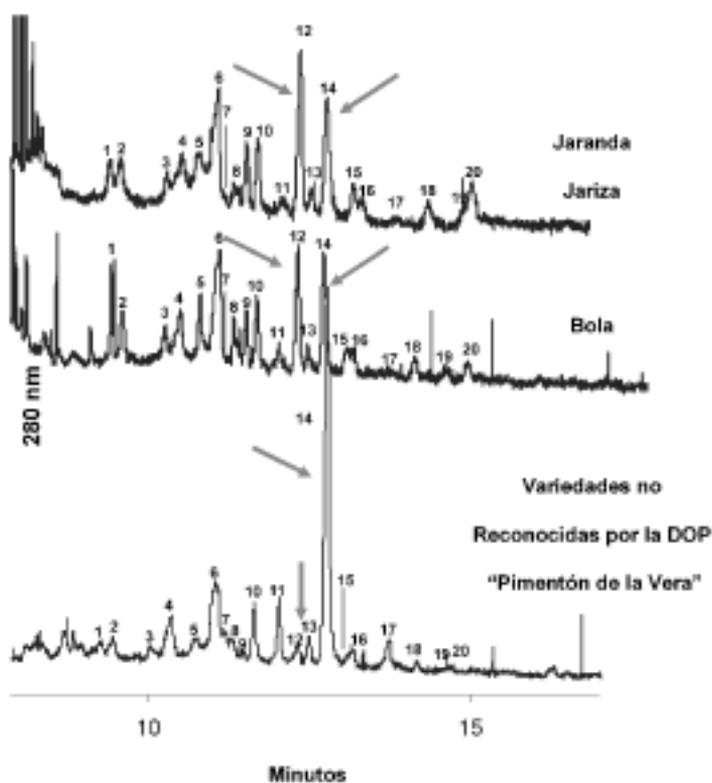
GRÁFICO 3: Fracción de proteínas hidrófilas de pimentones elaborados con variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” analizados mediante ECZ.



estando presente en pimentones secados por el método tradicional al humo empleado en la Vera, dado que en pimentones elaborados con variedades no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” y secados por métodos diferentes al ahumado este pico 25 no aparecía.

Por su parte, mediante el análisis de la fracción hidrofóbica de la partición de proteínas con el detergente Triton X-114, se obtuvieron límites de detección de variedades no reconocidas en la mezcla inferiores al 10% mediante el estudio de los picos 12, 14, y la ratio entre el pico 14/12 (gráfico 4).

GRÁFICO 4: Fracción de proteínas hidrófobas de pimentones elaborados con variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” analizados mediante ECZ.



3.3. Técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos

Existe poco conocimiento de la diversidad genética entre los pimientos cultivados, aunque es conocido que las variedades comerciales de los cultivos vegetales están basados en una variación genética cada vez más estrecha (Ballester y Vicente, 1998). Consecuentemente, la discriminación de variedades o la determinación de la pureza genética es cada vez más difícil. Entre otros motivos, esta necesidad de diferenciar cul-

tivos cada vez más próximos genéticamente, ha fomentado el desarrollo de los marcadores genéticos.

Los marcadores de ADN son usados para diversos propósitos, entre los que se encuentran caracterizar las variedades o cultivares, y la discriminación de fraudes alimentarios (Woolfe y Primrose, 2004). Los primeros marcadores de ADN usados en plantas fueron los análisis de las variaciones en los fragmentos generados por endonucleasas, generalmente denominados polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Beckman y Soller, 1983). De cualquier manera, con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), los sistemas de marcadores basados en la PCR han emergido como la mejor herramienta para diversos análisis genéticos. Estos sistemas de marcadores incluyen la “PCR aleatoria”, determinada por la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA o RAPD) (Williams *et al.*, 1990). Otras técnicas desarrolladas son el empleo de microsatélites, conocida también como repeticiones de secuencia simple o SSRs (Broun y Tanksley, 1996), secuencias entre repeticiones simples-PCR o ISSR-PCR (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y análisis de polimorfismo de los fragmentos de ADN amplificado o AFLP (Amplified Length Polymorphisms) (Vos *et al.*, 1995). Además, estas técnicas basadas en los métodos de PCR tienen la ventaja de la rapidez y sensibilidad para la identificación de variedades.

Entre las técnicas de PCR, el RAPD-PCR y el SSR han resultado especialmente útiles para el estudio de variedades vegetales. Así se ha demostrado que la técnica del RAPD puede ser eficiente para la identificación de variedades y de la pureza de híbridos de *Capsicum annuum* (Ballester y Vicente, 1998; Ruanet *et al.*, 2004). Arroyo (2001) desarrolló un método de detección de mezclas de pimentones de la Vera y foráneos. En otros productos alimenticios, los RAPD han servido para asegurar la especificidad de la materia prima (Martínez e Yman, 1998; Calvo *et al.*, 2001). Por su parte, los microsatélites han sido ampliamente utilizados para la caracterización de variedades de plantas (Westman y Kresovich, 1998), y en especial del género *Capsicum* (Kwon *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005).

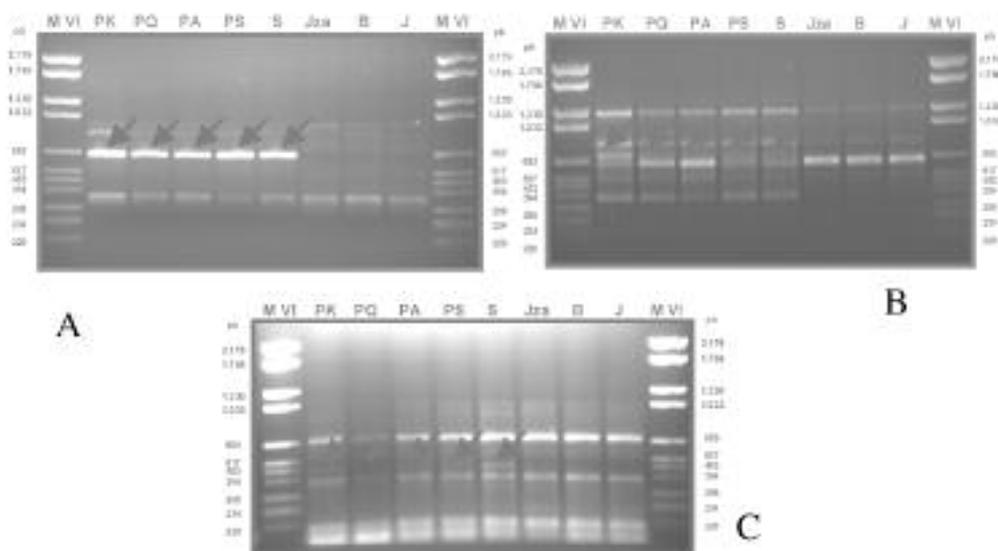
En este estudio ambas técnicas han sido muy efectivas para la diferenciación de pimentones elaborados con variedades reconocidas (Jaranda, Jariza y Bola) y no reconocidas (Sonora, PS9794, Papri Ace, Papri Queen y Papri King) por la DOP “Pimentón de la Vera”. Se han investigado las variaciones genéticas mediante el uso de 28 cebadores RAPD, los cuales amplifican bandas de ADN inespecíficas, y 4 cebadores SSR, que amplifican regiones concretas del ADN. El porcentaje de variación genética encontrada con estos cebadores fue alto, observándose diferencias entre las variedades estudiadas con el 75% de los cebadores empleados. Asimismo, con los 32 cebadores utilizados se obtuvieron 93 bandas de ADN que permitían diferenciar, al menos, una de las variedades estudiadas respecto al resto.

Desde el punto de vista de la detección de mezclas fraudulentas en el “Pimentón de la Vera”, los cebadores interesantes son aquellos que amplifiquen bandas presentes en una o varias de las variedades no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” y que no se encuentren en ninguna de las reconocidas por la misma. Estas características las cumplían 23 de los cebadores ensayados, 21 RAPD y 2 SSR. Aunque todos estos

cebadores son interesantes para el estudio de mezclas de pimentones elaborados con variedades reconocidas y no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera”, los cebadores más útiles serían aquellos que fuesen capaz de amplificar bandas presentes en todas las variedades no reconocidas, y ausentes en todas las reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera”. Esto se debe a que es imposible saber en cada caso particular que variedad de pimiento, no reconocida por la DOP pimentón de la Vera, se utiliza para elaborar la mezcla fraudulenta. Siendo así, habría que realizar varios análisis de PCR simultáneos para detectar posibles mezclas fraudulentas. En este sentido, gracias a este estudio se obtuvieron tres cebadores (S13, S22 y SSR1), capaces de amplificar una banda de PCR característica de todas las variedades no reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” y no presente en las variedades veratas.

Estos tres cebadores fueron utilizados para detectar mezclas artificiales de pimentones entre las variedades reconocidas por la DOP “Pimentón de la Vera” y las no reconocidas. Se ensayaron porcentajes de mezclas del 5, 10, 20, 40 y 80% de las variedades Sonora, PS9794, Papri Ace, Papri Queen y Papri King en las variedades Jaranda, Jariza y Bola. Con el análisis de las bandas señaladas en la figura 5 fue posible detectar porcentajes de mezcla fraudulenta de hasta el 5% con el cebador S13, mientras que con los cebadores S22 y SSR1 se obtuvieron límites de detección del 10%.

GRÁFICO 5: Geles de agarosa de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores S13 (A), S22 (B) y SSR1 (C) de las variedades de pimiento Jaranda (J), Bola (B), Jariza (Jza), Sonora (S), PS9794 (PS), Papri Ace (PA), Papri Queen (PQ) y Papri King (PK). En los extremos de los geles aparece el marcador de peso molecular 2,1-0,07 kpb (M IV).



BIBLIOGRAFÍA

- Anu, A. y Peter, K. V. (2003). *Analysis of seed protein of 29 lines of Capsicum annuum L. by polyacrylamide gel electrophoresis*. Genetic Resource and Crop Evolution. 50, 239-243.
- Arroyo, M. (2001). *Caracterización de las variedades utilizadas en la elaboración de pimentón de La Vera*. Trabajo de Grado. Departamento de Zootecnia. Universidad de Extremadura (Badajoz).
- Ayuso, M. C. (1998). *Utilización de sistemas espectrofotométricos y ópticos para la determinación de la calidad del pimentón. Caracterización del pimentón de La Vera*. Tesis Doctoral.
- Ballester, J. y de Vicente, C. (1998). *Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers*. Euphytica. 103, 223-226.
- Bartolomé, T. (1989). *La agricultura y la ganadería Extremeñas en el año 1988. Cap. XV: "Pimiento para pimentón"*. Caja de Badajoz-Departamento de Economía Aplicada y organización de Empresas de la U. E. X. Badajoz.
- Bartolomé, T., Coletto, J. M. y Velázquez, R. (1999). *The traditional system of drying peppers used in the production of La Vera paprika with a Guarantee of Origin*. 1st International Conference on Alternative and Traditional Use of Paprika. Szeged Hungary.
- Bartolomé, T. (2002). *El cultivo de pimiento para pimentón en España: situación actual y problemática del sector*. En: Jornada sobre mecanización del cultivo de pimiento para industria. Ejea de los Caballeros. 23 de Octubre de 2002.
- Bean, S. R., Lookhart, G. L. y Bietz, J. A. (2000). *Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (mays L.) and sorghum bicolor L. Moench storage proteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, 318-327.
- Becerra, V. y Paredes, M. (2000). *Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudio de diversidad genética*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA (Chile). Agricultura Técnica. 60 (3), 270-281.
- Beckmann, J. S. y Soller, M. (1986). *Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement*. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Mifflin, B. J. (Ed.). 3, 197-250.
- Bonetti, A., Marotti, I., Catizone, P., Dinelli, G., Maietti, A., Tedeschi, P. y Brandolini, V. (2004). *Compared use of HPLC and FZCE for cluster analysis of Triticum spp. and for identification of T. durum adulteration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 4080-4089.
- Bosland, P. W., Bailey, A. L. e Iglesias-Olivas, J. (1996). *Capsicum pepper varieties and classification*. NM Coop. Ext. Serv. Circ., Las Cruces NM. 530.

- Broun, P. y Tanksley, S. D. (1996). *Characterisation and genetic mapping of simple sequences in the tomato genome*. Molecular and General Genetics. 250, 39-49.
- Calvo, J. H., Zaragoza, P. y Osta, R. (2001). *Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry p ate*. Poultry Science. 80, 522-524.
- Cifuentes, A., de Frutos, M. y Diez-Masa, J. C. (1994). *Polymeric networks vs. cross-linked polyacrylamide bonded gels for CE separations of whey proteins*. American Laboratory. 26, 46-51.
- Cooke, R. J. (1992). *Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook: Variety identification*. The International Seed Testing Association, Zurich.
- Cota-Rivas, M. y Vallejo-Córdoba, B. (1997). *Capillary electrophoresis for meat species differentiation*. Journal of Capillary Electrophoresis. 4 (4), 195-199.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2005). Base de datos de la FAOSTAT. Búsqueda de datos de países por producto. Producto pimentón. Descargado de la web: <http://www.fao.org/es/ess/top/topProduction.jsp>.
- Flurer, C. L., Crowe, J. B. y Wolnik, K. A. (2000). *Detection of adulteration of locust bean gum with guar gum by capillary electrophoresis and polarized light microscopy*. Food Additives and Contaminants. 17, 3-15.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba, M. G. (2006). *Detection of smoked paprika "Pimentón de la Vera" adulteration by Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (12), 4141-4147.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Bartolomé, T., Córdoba, M. G. (2007). *Application of temperatura-induced phase partition of proteins for the detection of smoked paprika adulteraci n by Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE)*. Food Chemistry. On line.
- Kwon, Y. S., Lee, J. M., Yi, G. B., Yi, S. I., Kim, K. M., Soh, E. H., Bae, K. M., Park, E. K., Song, I. H. y Kim, B. D. (2005). *Use of SSR markers to complement test of Distinctiveness, Uniformity, and Stability (DUS) of pepper (Capsicum annuum L.) varieties*. Molecules and Cells. 19, 428-435.
- Little, A. C. y Mackinney, G. (1972). *The colour of foods*. World Review of Nutrition and Diet. 14, 59-84.
- Lucchese, C., Dinelli, G., Miggiano, A. y Lovato, A. (1999). *Identification of pepper (Capsicum spp.) cultivars by field and electrophoresis tests*. Seed Science and Technology. 27, 37-47.
- Manabe, T. (1999). *Capillary electrophoresis o proteins for proteomic studies*. Electrophoresis. 20, 3116-3121.
- Martínez, I. e Yman, I. M. (1998). *Species identification in meat products by RAPD analysis*. Food Research International. 31, 459-466.

- Mínguez-Mosquera, M. I., Garrido-Fernández, J. y Pereda, J. (1984). *Pimiento pimentonero. Relación entre los pigmentos carotenoides rojos y amarillos*. Grasas y Aceites. 35 (1), 4-10.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. (1994). *Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (Capsicum annuum L.) of the "Bola" and "Agridulce" varieties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42 (7), 1555-1560.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. (1994b). *Carotenoid metabolism during the slow drying of peppers fruits of the "Agridulce" variety*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 41 (11), 2260-2264.
- Navarro, F. y Costa, J. (1994). *Criterios de calidad de algunas variedades de pimientos para pimentón*. Departamento Química Física. Universidad de Murcia. Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (CIDA). La Alberca.
- Pérez-Gálvez, A., Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M. I. (2004). *Changes in the carotenoid metabolism of Capsicum fruits during application of modeled slow drying process for paprika production*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 518-522.
- Piergiovanni, A. R. y Taranto, G. (2005). *Specific differentiation in Vicia genus by means of capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A. 1069, 253-260.
- Ruanet, V. V., Kochieva, E. Z. y Ryzhova, N. N. (2004). *The use of a self-organizing feature map for the treatment of the results of RAPD and ISSR analyses in studies on the genomic polymorphism in the genus Capsicum L.* Russian Journal of Genetics. 41 (2), 202-210.
- Salmerón, P. (1973). *El color en los procesos de elaboración del pimentón*. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Instituto de Orientación y Asistencia Técnica del Suroeste, Murcia.
- Serradilla, J. V. (1998). *El pimentón de La Vera*. Colección Monográfica. Junta de Extremadura.
- Srivalli, T., Lakshmi, N. y Gupta, C. H. G. (1999). *Analysis of seed proteins by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in diploids, tetraploids and tetraploid hybrids of C. annuum*. Capsicum and Eggplant Newsletter. 18, 48-51.
- Tam, S. M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S. R. y Grandbastien, M. A. (2005). *Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR*. Theoretical and Applied Genetic. 110 (5), 819-831.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). *AFLP, a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research. 23, 4407-4414.

- Weiss, W., Postel, W. y Görg, A. (1991). *Barley cultivar discrimination: II. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing with immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*. 12 (5), 330-337.
- Westman, A. L. y Kresovich, S. (1998). *The potential for cross taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between Arabidopsis thaliana L. and crop brassicas*. *Theoretical and Applied Genetic*. 96, 272-281.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531-6535.
- Woolfe, M. y Primrose, S. (2004). *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*. *Trends in Biotechnology*. 22 (5), 222-226.
- Wrigley, C. W. (1992). *Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins*. En: *Seed Analysis*. Linskens, H. F., Jackson, J. F. (Eds.). Springer, Berlin, Germany. 17-41.
- Yan, Y., Surlan-Momirovic, G., Prodanovic, S., Zoric, D. y Liu, G. (1999). *Capillary zone electrophoresis analysis of gliadin proteins from Chinese and Yugoslav winter wheat cultivars*. *Euphytica*. 105, 197-204.
- Zapata, M., Bañón, S. y Cabrera, P. (1992). *El pimiento para pimentón*. Editorial Mundiprensa. Madrid.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994). *Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification*. *Genomics*. 20, 176-183.