

DETERMINAÇÃO DE CAPSAICINOIDES EM EXTRATOS DE PIMENTA (*CAPSICUM* SSP.) POR HPLC-DAD

Cesar Henrique de Souza (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruna Cristina Bernardi, Carina Alexandra Rodrigues, Liane Maldaner (Orientadora), e-mail: sousacesarhenrique@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR

Ciências Exatas e da Terra / Química / Química Analítica

Palavras-chave: capsaicinoides, μ -QuEChERS, pimenta

Resumo:

Os capsaicinoides são alcaloides de ocorrência natural, produzidos como um metabólito secundário pelas pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum*, e são responsáveis pela pungência dos frutos. Entretanto, além de serem responsáveis pela pungência, os capsaicinoides vêm sendo associados a uma série de propriedades biológicas promotoras da saúde humana, como atividade anti-inflamatória, antifúngica, antiviral entre outras. Assim, a determinação quantitativa dos capsaicinoides nas diversas variedades e espécies de pimenta, poderá impulsionar a expansão da aplicação desses extratos nas áreas farmacêuticas, alimentícia e clínica. Assim, neste trabalho avaliou-se o emprego do método μ -QuEChERS, para a determinação quantitativa dos capsaicinoides, capsaicina e a dihidrocapsaicina, os quais são responsáveis por 90% da pungência total das pimentas picantes. O método μ -QuEChERS-HPLC-DAD desenvolvido apresentou um desempenho analítico satisfatório para ser aplicado na quantificação dos capsaicinoides em amostras de pimenta. Foram avaliadas cinco variedades de pimentas, e as quantidades de capsaicina e dihidrocapsaicina variaram de acordo com a variedade e espécie de pimenta avaliada, sendo a variedade "Bhut Jolokia Assam", que é um híbrido das espécies *C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq., aquela que apresentou a maior quantidade de capsaicinoides ($6836,2 \pm 171,1$ mg kg⁻¹). Essa quantidade foi em média 10 vezes maior que as quantidades encontradas nas variedades "Habanero" e "Malagueta" e 28 e 42 vezes maior que as quantidades encontradas nas variedades "Jalapeño" e "Dedo-de-moça", respectivamente.

Introdução

As pimentas do gênero *Capsicum*, originárias da América Central, constituem um importante segmento no setor da agricultura e da indústria alimentícia, sendo considerado o condimento picante mais consumido no mundo. Acredita-se que existam aproximadamente trinta espécies de pimentas que apresentam características doces e picantes (Kothari *et al.*, 2010). As espécies *Capsicum* são uma fonte importante de minerais, compostos fenólicos, carotenoides, vitamina C e

de capsaicinoides. Os capsaicinoides são alcaloides de ocorrência natural que estão presentes exclusivamente no gênero *Capsicum*, e a capsaicina e a dihidrocapsaicina são responsáveis por 90% da pungência total das pimentas picantes. No metabolismo humano, os capsaicinoides exercem múltiplos efeitos farmacológicos e fisiológicos, incluindo as atividades de analgesia, anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante e antiobesidade (Hayman e Kam, 2008, Luo *et al.*, 2011). Considerando as propriedades dos capsaicinoides e a sua aplicação atual na indústria alimentícia, na área médica como fármacos, em *sprays* defensivos e no consumo *in natura*, os capsaicinoides têm sido amplamente estudados, e para este fim tem havido uma demanda crescente por novos métodos analíticos, mais confiáveis e precisos, para a identificação e a quantificação destes compostos. Dentro deste contexto podemos destacar o método μ -QuEChERS (acrônimo de *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) como técnica de preparo de amostra, o qual, visa a extração dos compostos com rapidez, simplicidade, baixo custo, além de estar associado a uma etapa eficiente de *clean-up* e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD do inglês, *high performance liquid chromatography coupled to diode array detector*) como técnica de análise. Assim, esse trabalho tem como objetivo quantificar os capsaicinoides, capsaicina e dihidrocapsaicina, presentes em diferentes variedades de pimenta empregando o método μ -QuEChERS-HPLC-DAD desenvolvido.

Materiais e Métodos

As amostras de pimentas, “Malagueta” (*C. frutescens* L.), “Dedo-de-moça” (*C. baccatum* L.), “Jalapeño” (*C. annuum* L.), “Habanero” e “Biquinho” (*C. chinense* Jacq.) e “Bhut Jolokia Assam” (*C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq. - híbrida) foram adquiridas na feira do produtor de Maringá – PR e lavadas em água corrente, as sementes retiradas manualmente, picadas, trituradas, embaladas à vácuo e armazenadas em freezer a temperatura de -18°C até a realização das análises. Para a otimização e desenvolvimento do método foi empregada a pimenta “Biquinho”, uma variedade sem capsaicinoides.

O método μ -QuEChERS acetato otimizado foi baseado nos trabalhos de Rodrigues *et al.*, 2019 e Rodrigues *et al.*, 2022, com modificações. Em um tubo de centrífuga de 15,0 mL foi pesado 1,0 g de amostra. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v), e os tubos foram agitados em vórtex durante 1 min. Na etapa de partição, foram adicionados 0,4 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e 0,1 g de acetato de sódio (CH_3COONa) e os tubos foram agitados novamente em vórtex por 1 min e imediatamente centrifugados por 10 min a 5000 rpm

Os extratos obtidos na etapa anterior, foram submetidos à etapa de limpeza com o emprego da extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid-phase extraction*). Para isso, 800 μL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15,0 mL contendo previamente 75 mg MgSO_4 e 12,5 mg de amina primária e secundária (PSA) + 1,6 mg de carbono grafitizado (GCB). Essa mistura foi agitada em vórtex por 1 min, e centrifugada por 10 min a 5000 rpm. Em

seguida, uma alíquota de 10 µL foi submetida a análise cromatográfica por HPLC-DAD em $\lambda = 280$ nm.

Resultados e Discussão

O método μ -QuEChERS-HPLC-DAD apresentou boa linearidade ($r^2 > 0,999$) na faixa de aplicação do método (0,5 e 25,0 mg kg⁻¹) e valores limites de quantificação (LQ) de 0,4 e 0,3 mg kg⁻¹ para a capsaicina e a dihidrocapsaicina, respectivamente, indicando que os compostos podem ser quantificados nas amostras de pimenta em baixas concentrações. Além disso, apresentou altas porcentagens de recuperação, 86,4% para a capsaicina e de 84,4% para a dihidrocapsaicina e baixas porcentagens de efeito matriz, -20,6% e -1,6%, respectivamente para a capsaicina e a dihidrocapsaicina. Valores de efeito matriz $\leq \pm 20\%$ não indicam efeito matriz.

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de capsaicina e dihidrocapsaicina em amostras de pimenta de diferentes variedades conforme apresentado na Tabela 1. De acordo com os resultados, pode-se observar que as quantidades dos capsaicinoides variaram de acordo com as espécies e as variedades de pimenta. Na variedade "Bhut Jolokia Assam" que é um híbrido das espécies *C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq. foi encontrada a maior quantidade de capsaicinoides (6836,2 $\pm$ 171,1 mg kg⁻¹). Essa quantidade foi em média 10 vezes maior que as quantidades encontradas nas variedades "Habanero" (*C. chinense* Jacq.) e "Malagueta" (*C. frutescens* L.) e 28 e 42 vezes maior que as quantidades encontradas nas variedades "Jalapeño" (*C. annuum* L.) e "Dedo-de-moça" (*C. baccatum* L.), respectivamente. Essa variação nas quantidades de capsaicinoides entre as variedades pode ser explicada pela extensa variabilidade genética encontrada no gênero *Capsicum*. O gênero *Capsicum* comporta mais de 30 espécies de pimenta e uma lista enorme de variedades derivadas distribuídas ao redor do mundo, acarretando variedades e espécies com maiores e menores quantidades de capsaicinoides.

Tabela 1: Concentração dos capsaicinoides encontrados nas variedades de pimenta *Capsicum* spp. utilizando o método μ -QuEChERS-HPLC-DAD.

<i>Capsicum</i> spp.	Variedades	Capsaicina (mg kg ⁻¹)	Dihidrocapsaicina (mg kg ⁻¹)	Capsaicinoides total (mg kg ⁻¹)
<i>C. annuum</i> L.	"Jalapeño"	138,0 $\pm$ 3,2	106,0 $\pm$ 3,2	244,0 $\pm$ 6,4
<i>C. baccatum</i> L.	"Dedo-de-moça"	110,0 $\pm$ 3,8	51,0 $\pm$ 2,7	161,0 $\pm$ 6,5
<i>C. frutescens</i> L.	"Malagueta"	318,0 $\pm$ 6,6	297,0 $\pm$ 5,5	615,0 $\pm$ 12,1
<i>C. chinense</i> Jacq.	"Habanero"	529,4 $\pm$ 30,6	169,0 $\pm$ 5,4	698,4 $\pm$ 31,5
<i>C. frutescens</i> L. e <i>C.</i> <i>chinense</i> Jacq.	"Bhut Jolokia Assam"	4970,6 $\pm$ 140,0	1865,6 $\pm$ 31,1	6836,2 $\pm$ 171,1

(híbrida)

Conclusões

A partir dos resultados desse trabalho, foi possível concluir que o método μ -QuEChERS-HPLC-DAD apresentou um desempenho analítico satisfatório, para ser empregado na quantificação da capsaicina e da dihidrocapsaicina em amostras de pimenta. Sendo assim, esse método é uma alternativa promissora para a quantificação de capsaicinoides em diferentes extratos de pimenta. Além disso, os resultados da aplicação do método mostraram que as quantidades de capsaicina e dihidrocapsaicina variaram significativamente de acordo com a variedade e espécie de pimenta avaliada, sendo as variedades das espécies *C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq., as que apresentaram maior quantidade. Cabe ressaltar que os capsaicinoides além de serem responsáveis pela pungência das pimentas, também têm sido associados a uma série de propriedades biológicas promotoras da saúde humana, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral entre outras. Assim, a determinação quantitativa dos capsaicinoides realizada nesse estudo poderá contribuir para aplicações futuras desses extratos em diversas variedades e espécies de pimenta, incluindo as áreas farmacêuticas, alimentícia e clínica.

Agradecimentos

Ao PIBIC, ao CNPq, à Fundação Araucária e à UEM.

Referências

Hayman, M.; Kam, P.C.A. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v.19, p.338-343, 2008.

Kothari, S.L.; Joshi, A.; Kachhwaha, S.; Ochoa-Alejo, N. Chilli peppers — A review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, v.28, p.35-48, 2010.

Rodrigues, C.A.; et al. Determination of phenolic compounds in red sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS analysis and its relation to antioxidant activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, Nº6, p.1229-1240, 2019.

Rodrigues, C.A.; et al. A μ -QuEChERS method combined with UHPLC-MS/MS for the analysis of phenolic compounds in red pepper varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, 112, 2022, 104647.

Luo, X-J.; Peng, J.; Li, Y-J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v.650, p.1-7, 2011.