

APLICAÇÃO DO MÉTODO μ -QUECHERS PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PIMENTAS (*CAPSICUM SPP.*)

Carina Alexandra Rodrigues¹, Ana Paula Lourenção Zomer², Jesui Vergílio Visentainer³,
Liane Maldaner⁴

¹Acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista CAPES. carinarodrigues4944@hotmail.com

²Acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Química, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista CAPES. ana.p.zomer15@hotmail.com

³Docente, Doutor, Departamento de Química. Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Química – PQU, Universidade Estadual de Maringá – UEM. jesuivv@gmail.com

⁴Orientadora, Doutora, Departamento de Química. Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Química – PQU, Universidade Estadual de Maringá – UEM. lianemaldaner@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho, foi empregado um procedimento de preparo de amostra miniaturizado do método QuEChERS (μ -QUECHERS), seguido de análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) para a determinação de quatorze compostos fenólicos de onze variedades de pimentas (*Capsicum spp.*). A partir da aplicação do método μ -QUECHERS-UHPLC-MS/MS foram encontrados nove compostos fenólicos distribuídos entre as onze variedades de pimenta avaliadas, com destaque para o ácido vanílico ($13801 \mu\text{g kg}^{-1}$), ácido ferúlico ($5959 \mu\text{g kg}^{-1}$) e naringenina ($13458 \mu\text{g kg}^{-1}$), nas variedades "Brazilian Moruga", "Fatalii Gourmet Jigsaw" e "Malagueta", respectivamente. Além disso, a miniaturização do método permitiu a redução da quantidade de amostra, solventes e reagentes, contribuindo para a redução do custo da análise e da quantidade de resíduos gerados.

PALAVRAS-CHAVE: Composição fenólica; Miniaturização; Quantificação; Redução de custos.

1 INTRODUÇÃO

As pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum* são originárias da América Central e acredita-se que existam mais de trinta diferentes espécies de pimentas que apresentam características doces e picantes (KOTHARI *et al.*, 2010). Dentre essas espécies, cinco principais se destacam pela extensa produção e por terem sido domesticadas em todo mundo, sendo elas, *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. pubescens* e *C. annuum* L., constituindo um importante segmento no setor da agricultura e da indústria alimentícia, sendo considerada um dos condimentos picantes mais consumidos no mundo (KOTHARI *et al.*, 2010, ROMAN *et al.*, 2011). Embora o consumo das pimentas esteja principalmente associado ao fato de agregar cor e sabor aos alimentos, estudos têm relatado propriedades biológicas importantes para algumas espécies de pimentas, como atividade antioxidante, antidiabética e anticâncer que podem estar associadas à presença de compostos fenólicos, principalmente os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, flavonóides e seus derivados glicosilados (SRICHAROEN *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2011; LOIZZO *et al.*, 2015).

Atualmente há um interesse crescente na determinação de compostos fenólicos nas mais diversas matrizes vegetais, que são as fontes naturais mais abundantes e importantes desses compostos. No entanto, para isso, é necessário o emprego de técnicas de preparo de amostra eficientes, que garantam a extração seletiva desses analitos bem como, a remoção dos interferentes presentes nessas matrizes e que apresentam baixo custo e redução na geração de resíduos (CASADO *et al.*, 2020). Nesse sentido, existe uma vasta tendência no emprego de técnicas de preparo de amostra miniaturizadas, que tem como principais vantagens, a redução da quantidade de amostra, solventes e reagentes, o que também leva à redução de custos e menor geração de resíduos, superando as limitações apresentadas pelas técnicas convencionais (PERESTRELO *et al.*, 2019). Além disso, a

miniaturização também pode estar associada à redução do número de etapas e do tempo de análise (CASADO *et al.*, 2020). Dentro deste contexto, podemos destacar o método μ -QuEChERS (do inglês, *micro-quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que é a miniaturização do método QuEChERS tradicional (do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). O μ -QuEChERS além de manter as inúmeras vantagens apresentadas pelo método QuEChERS tradicional, como simplificação e número reduzido de etapas, utilização de etapa de limpeza, instrumentação simples e de baixo custo de aquisição e manutenção, tempo de análise curto e procedimento de fácil operação e com baixa exposição do analista, também vem apresentando melhorias, principalmente na redução na quantidade de amostra, solventes e reagentes (PERESTRELO *et al.*, 2019).

Considerando as vantagens apresentadas pelas tendências atuais de miniaturização das técnicas de preparo de amostra e dos benefícios dos compostos fenólicos para a saúde humana, o objetivo principal deste estudo é aplicar um método μ -QuEChERS combinado com UHPLC-MS/MS para determinar quatorze compostos fenólicos em onze variedades de pimentas vermelhas (*Capsicum* spp.), sendo algumas delas, estudadas pela primeira vez.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, onze variedades de pimenta vermelha pertencentes a diferentes espécies do gênero *Capsicum* foram adquiridas no comércio local em Maringá, Paraná, Brasil. Dentre as variedades estão: (i) *C. annuum* L.: "Jalapeño", (ii) *C. Baccatum* L.: "Dedo-de-moça" e "Cambuci", (iii) *C. Frutescens* L.: "Malagueta", (iv) *C. Chinense* Jacq.: "Big Red Mama", "Brazilian Moruga", "Biquinho", "Habanero", "Naga Morich" e "Fatalii Gourmet Jigsaw", e (v) a variedade híbrida das espécies *C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq.: "Bhut Jolokia Assam". As pimentas foram lavadas em água corrente, e as sementes foram removidas com o auxílio de uma pinça. Após a separação, as frutas foram trituradas, embaladas sob vácuo e armazenadas em freezer a -18°C até a realização das análises.

Para a extração dos compostos fenólicos foi empregado o método QuEChERS acetato em escala reduzida (μ -QuEChERS). A redução foi de 10 e de 2 vezes para a etapa de extração/partição e de limpeza, respectivamente. Para isso, em um tubo de centrífuga de 15,0 mL foi pesado 1,0 g de amostra, seguido da adição de 1,0 mL de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético (v/v), e o tubo foi agitado 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. Para a etapa de limpeza, 800 μL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 15,0 mL contendo 75,0 mg de MgSO_4 , 12,5 mg de amina primária e secundária (PSA) e 3,1 mg de carbono grafitizado (GCB). A mistura foi agitada por 1 min em vórtex e centrifugada por 10 min a 5000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa de politetrafluoretileno (PTFE), com diâmetro de poro de 0,22 μm e submetido à análise por UHPLC-MS/MS. A quantificação foi realizada pelo método de adição padrão em cinco níveis de concentração (25 a 10000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) apresentando boa linearidade com coeficiente de correlação (r) superiores a 0,992. O limite de quantificação (LQ) foi calculado como a quantidade de analito capaz de produzir um pico cromatográfico dez vezes maior que o ruído da linha base em um cromatograma da amostra. Os valores de LQ para todos os analitos foram inferiores a 290 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método μ -QuEChERS acetato foi aplicado nos extratos de onze variedades de pimenta vermelha, os quais foram submetidos à análise cromatográfica para fins de identificação e quantificação. Para isso, um método UHPLC-MS/MS foi utilizado para determinar simultaneamente quatorze compostos fenólicos comumente relatados em amostras de pimenta, sendo eles, os ácidos gálico, clorogênico, 4-hidroxibenzóico, vanílico, cafeico, *p*-cumárico, sinápico e ferúlico, a miricetina, quercetina, luteolina, naringenina, kaempferol e apigenina. Na Tabela 1 estão apresentados os compostos fenólicos que foram encontrados nas variedades de pimentas avaliadas. De modo geral, podemos observar na Tabela 1 que os compostos fenólicos encontrados bem como as suas concentrações variaram entre as variedades das diferentes espécies de pimentas avaliadas. Entretanto, em todas as variedades foram encontrados os ácidos 4-hidroxibenzóico ($115 - 774 \mu\text{g kg}^{-1}$), *p*-cumárico ($126 - 706 \mu\text{g kg}^{-1}$), ferúlico ($1618 - 5959 \mu\text{g kg}^{-1}$), vanílico ($757 - 13801 \mu\text{g kg}^{-1}$) (exceto para a “Cambuci”) e a naringenina ($331 - 13458 \mu\text{g kg}^{-1}$), com destaque para as variedades “Malagueta”, “Braziliam Moruga”, “Naga Morich”, “Fatalii Gourmet Jigsaw” e “Bhut Jolokia Assam” que apresentaram as maiores concentrações. Além disso, exceto para a “Malagueta”, as demais variedades destacadas carecem de informações na literatura acerca da composição fenólica, sendo que, até onde sabemos, foram avaliadas pela primeira vez no presente trabalho. Por outro lado, os ácidos gálico, cafeico e clorogênico, a apigenina, kaempferol, miricetina, luteolina e quercetina, que comumente são relatados na literatura para as pimentas e que não foram encontrados em nenhuma ou em poucas variedades avaliadas no nosso trabalho, pode estar relacionada com o fato de que a quantidade desses compostos na sua forma livre (aglicona) são baixas, sendo necessário uma etapa adicional de hidrólise no método de extração, não sendo o intuito do presente trabalho ao empregar o μ -QuEChERS.

Tabela 1: Compostos fenólicos encontrados nas diferentes variedades de pimenta vermelha avaliadas empregando o μ -QuEChERS-UHPLC/MS/MS

Compostos Fenólicos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)										
	<i>C. annuum</i> L.	<i>C. Baccatum</i> L.		<i>C. Frutescens</i> L.	<i>C. Chinense</i> Jacq.				Espécie híbrida*		
	"Jalapeño"	"Dedo-de-moça"	"Cambuci"	"Malagueta"	"Big Red Mama"	"Brazilian Moruga"	"Biquinho"	"Habanero"	"Naga Morich"	"Fatalii Gourmet Jigsaw"	"Bhut Jolokia Assam"
Ácido Gálico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido 4-Hidroxibenzóico	115 ^e ±2	496 ^{bc} ±27	537 ^b ±44	226 ^d ±4	748 ^a ±18	434 ^c ±13	227 ^d ±5	254 ^d ±2	774 ^a ±16	430 ^c ±27	770 ^a ±11
Ácido Vanílico	757 ^f ±6	2016 ^e ±18	nd	1330 ^{ef} ±89	9096 ^c ±190	13801 ^a ±825	7126 ^d ±217	6553 ^d ±159	11544 ^b ±189	7170 ^d ±301	13596 ^a ±204
Ácido Cafeico	277 ^a ±17	nd	nd	nd	196 ^b ±21	nd	nd	<LQ	nd	183 ^b ±13	<LQ
Ácido Clorogênico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido <i>p</i> -Cumárico	152 ^f ±3	268 ^d ±8	553 ^b ±3	706 ^a ±7	480 ^c ±34	135 ^f ±8	147 ^f ±9	213 ^e ±9	126 ^f ±5	242 ^{de} ±10	150 ^f ±2
Ácido Ferúlico	2047 ^f ±63	4318 ^f ±106	1618 ^g ±46	4711 ^b ±33	3636 ^d ±79	2451 ^e ±35	3654 ^d ±26	3520 ^d ±89	2433 ^e ±26	5959 ^a ±68	4660 ^b ±51
Ácido Sinápico	993 ^a ±94	nd	nd	300 ^b ±20	145 ^c ±4	nd	927 ^a ±49	123 ^c ±11	nd	206 ^{bc} ±14	201 ^{bc} ±18
Naringenina	7840 ^c ±126	9148 ^b ±78	1561 ^g ±92	13458 ^a ±126	1163 ^{gh} ±81	4199 ^d ±249	1986 ^f ±222	331 ⁱ ±42	1676 ^g ±101	1003 ^h ±152	2568 ^e ±255
Apigenina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Luteolina	<LQ	<LQ	<LQ	46±3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Kaempferol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetina	<LQ	nd	<LQ	320 ^a ±12	224 ^b ±24	342 ^a ±34	nd	nd	156 ^b ±4	308 ^a ±25	204 ^b ±8
Miricetina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*Híbrido de *C. frutescens* L. e *C. chinense* Jacq

nd: não detectado; <LQ: menor do que o limite de quantificação; os compostos fenólicos seguidos da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo forneceu informações sobre a presença e a quantidade de quatorze compostos fenólicos de onze variedades de pimentas vermelhas pertencentes a quatro espécies. As variedades relatadas pela primeira vez, "Braziliam Moruga" e "Fatalii Gourmet Jigsaw", mostraram-se fontes importantes dos compostos majoritários ácido vinílico e ácido ferúlico, podendo contribuir em estudos futuros para a revelação de novas e promissoras atividades biológicas em extratos de pimentas. O método μ -QuEChERS acetato se mostrou promissor para análise de compostos fenólicos em matrizes alimentares, além de reduzir significativamente a quantidade de amostra, reagentes e solventes, contribuindo para a tendência atual de substituição das técnicas convencionais de preparo de amostra por técnicas miniaturizadas.

REFERÊNCIAS

KOTHARI, S. L. *et al.* Chilli peppers - A review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 35-48, 2010.

ROMAN, A. L. C. *et al.* Uso medicinal da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) em uma comunidade de várzea à margem do rio Amazonas, Santarém, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 6, n. 3, p. 543-557, 2011.

SRICHAROEN, P. *et al.* Phytochemicals in *Capsicum* oleoresin from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 629-639, 2017.

JEONG, W. Y. *et al.* Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 2967-2974, 2011.

LOIZZO, M. R. *et al.* Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 623-631, 2015.

CASADO, N. *et al.* Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: Micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials. **Trends in Food Science & Technology**, v. 98, p. 167-180, 2020.

PERESTRELO, R. *et al.* QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019.