

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA INDIRETA DE CAPSAICINOIDES EM PIMENTAS *Capsicum* A PARTIR DA REAÇÃO COM O COMPLEXO DE Co(II) COM 4-(2-PIRIDILAZO) RESORCINOL

Patrícia Tonon de Souza e Adriana Vitorino Rossi*

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 20/08/2013; aceito em 13/12/2013; publicado na web em 26/02/2014

INDIRECT SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CAPSAICINOIDS IN *Capsicum* PEPPERS USING THE REACTION OF COMPLEX Co(II) WITH 4-(2-PYRIDYLAZO) RESORCINOL. Capsaicinoids (CAPS) are substances responsible for pungency in *Capsicum*. It is important to quantify these types of compounds owing to their broad application in food, pharmaceuticals, cosmetics and chemical weapons. In this work, we developed an indirect spectrophotometric method based on the colorimetric reaction between CAPS, Co(II) 3.10×10^{-5} mol L⁻¹ and 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) 6.23×10^{-5} and, in cachaça:water 92:8v/v solutions, for quantification of total CAPS in *Capsicum* peppers. The product of the reaction is CoPAR₂CAPS₂ and its absorption in aquo-ethanolic solution at 510 nm is proportional to the total CAPS concentration from 0.60 to 17.94 mg L⁻¹. The values of limit of detection and limit of quantification were 0.0004 and 0.001 mg of CAPS/g of pepper, respectively, with 4% relative standard deviation. The developed method yielded similar results to those obtained from high performance liquid chromatography, with 95% of confidence.

Keywords: capsaicinoids; peppers; spectrophotometric quantification.

INTRODUÇÃO

Capsaicinoides (CAPS) são alcaloides muito encontrados em vegetais, nos quais atuam nos mecanismos de defesa das espécies, conferindo picância (ardência, pungência) aos frutos e sementes. CAPS também correspondem aos principais agentes terapêuticos naturais com ação anestésica, analgésica e também atuam como psicoestimulantes e neurodepressores.^{1,2} Pimentas e pimentões *Capsicum* representam importantes fontes naturais de CAPS,³ sendo que capsaicina (CAP) e dihidrocapsaicina (DHCAP) representam cerca de 90% dos CAPS mais comumente encontrados nessas espécies.⁴

O gênero *Capsicum* engloba cerca de 20 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação e cerca de 10 espécies silvestres. As pimentas já disseminadas pelos continentes são classificadas pelos botânicos em cinco espécies: as primeiras *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens*, depois *Capsicum annum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens*. Essas três últimas passaram a liderar a comercialização atual. De todas as várias espécies conhecidas, essas cinco são as mais cultivadas.⁵

Pimentas *Capsicum* apresentam propriedades químicas distintas e sem parentesco com outras pimentas, como a pimenta-do-reino ou pimenta-preta (*Piper nigrum* L., da família Piperaceae), a pimenta-rosa (*Schinus molle* L., da família Anacardiaceae) e a pimenta-da-jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl., da família Myrtaceae). Entre as *Capsicum*, os pimentões diferem das pimentas apenas por sua picância ou pungência reduzida, às vezes nem notada.⁶ A picância das pimentas *Capsicum* é enganosa, pois embora as pimentas pequenas sejam frequentemente consideradas as mais ardidas, pimentas grandes nem sempre são muito suaves.⁷ Os CAPS acumulam-se na vesícula da epiderme na parte interna dos frutos e nas sementes em níveis que variam com o genótipo, maturidade e condições de crescimento, sendo liberados naturalmente quando o fruto sofre algum dano físico e reduzidos após etapas de processamento.^{4,6}

As *Capsicum* são originárias das Américas e já no século XVII

atingiram distribuição mundial durante as legendárias viagens para a colonização do continente, tornando-se opção alternativa para a pimenta-do-reino, que naquela época era a pimenta favorita na Europa.⁸ Neste início do século XXI, a produção de pimentas *Capsicum* no Brasil atinge 40 mil toneladas anuais, em cerca de 2 mil hectares cultivados em quase todas as regiões do país. Os negócios de pimentas representam um expressivo segmento do mercado agrícola brasileiro, com forte mercado para aplicações industriais dos setores alimentício, farmacêutico e cosmético.⁶

Oleoresina é o termo usado para descrever extratos de CAPS obtidos a partir de um solvente específico e que pode ser removido para aplicações específicas. Para aditivos alimentares, a melhor oleoresina de *Capsicum* contém os componentes responsáveis por cor e sabor (como pungência e aroma), que recriam, em formulações alimentícias, as qualidades sensoriais dos materiais frescos. A pureza e a quantidade residual de solvente devem estar em conformidade com as especificações das legislações alimentares pertinentes.⁹

Oleoresina também serve para a produção de armas químicas. Uma formulação de oleoresina *in natura* de pimenta é usada em *sprays* ou bombas de efeito moral contendo óleos sintéticos que dificultam a remoção do produto. O gás de pimenta atua nas mucosas de olhos, nariz e boca causando irritação, ardor e sensação de pânico.¹⁰

Diversas técnicas são utilizadas para a extração de CAPS de pimentas: maceração,^{11,12} agitação mecânica,¹³ extração líquido-líquido,¹⁴ *soxhlet*,¹⁵ extração assistida por ultrassom,¹⁶⁻¹⁸ extração por fluido supercrítico,¹⁹⁻²¹ extração por líquido pressurizado,²² extração enzimática^{23,24} e extração assistida por micro-ondas.²⁵ No presente trabalho não se buscou realizar a extração exaustiva de CAPS, por isso optou-se por um procedimento simples e facilmente reproduzível para extração de CAPS das amostras de pimentas estudadas.

Dentre os métodos para a quantificação dos CAPS encontrados na literatura existem desde métodos organolépticos, que apesar da subjetividade inerente são amplamente aceitos como ponto de partida para a classificação das pimentas em escalas de picância,²⁶ até métodos instrumentais envolvendo diversas técnicas. Os métodos colorimétricos destacam-se pela variedade de reagentes adicionados

*e-mail: adriana@iqm.unicamp.br

aos extratos de CAPS para gerar produtos coloridos que podem ser relacionados à concentração de CAPS, sendo eles: sais de vanádio,²⁷ vanilina,²⁸ reagente *Folin Denis* (ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico),^{29,30} nitrito de sódio,³¹ nitrito de sódio e molibdato de sódio,³² cloreto férrico e ferricianeto de potássio,³³ tungstato de sódio e ácido fosfomolibdico.³⁴ Manirakiza *et al.*³⁵ trazem uma interessante revisão de trabalhos com uso dos seguintes reagentes colorimétricos: VOCl_3 , reagente de *Folin Denis*, vanadato de amônio e ácido clorídrico, ácido diazobenzeno sulfônico e ácido sulfanílico. A despeito dessa grande diversidade, de modo geral, nos métodos colorimétricos há dificuldades relacionadas com interferentes, reprodutibilidade dos resultados e/ou estabilidade do agente cromóforo, que subsidiaram novos estudos para modificações das propostas iniciais.³

Com técnicas mais sofisticadas, há diversos métodos analíticos envolvendo cromatografia gasosa, GC,^{36,37} cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS,^{35,38} cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC,^{36,39} e cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, UHPLC-MS,⁴⁰ para análise e/ou determinação de CAPS, porém, há dificuldades relevantes nas etapas de pré-concentração, purificação de reagentes e/ou separação individual dos CAPS. O método oficial para quantificar oleoresina de *Capsicum* emprega cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção em 280 nm.⁴¹

Neste trabalho, foi desenvolvido um método de baixo custo, para quantificar CAPS totais em extratos de pimentas *Capsicum*, com uma solução colorida e estável para medidas espectrofotométricas na região do visível obtida a partir da reação entre CAPS e o clássico complexo formado entre 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) e Co(II). Em geral, complexos de PAR com cátions metálicos são formados na proporção molar metal:ligante 1:1 ou 1:2 e são solúveis em água e solventes polares, com intensa coloração avermelhada.⁴² A Figura 1 ilustra a estrutura comum dos CAPS e a uma proposta de estrutura de CoPAR_2 . A solubilidade desse complexo serviu para aplicá-lo numa proposta de método analítico simples, utilizando soluções obtidas em cachaça que é um solvente típico para conservação de pimentas, utilizado por pequenos produtores ou cooperativas nacionais que trabalham com a produção de molhos, geléias ou conservas de pimentas para comercialização, embora resultados análogos tenham sido obtidos com dados de extratos etanólicos.

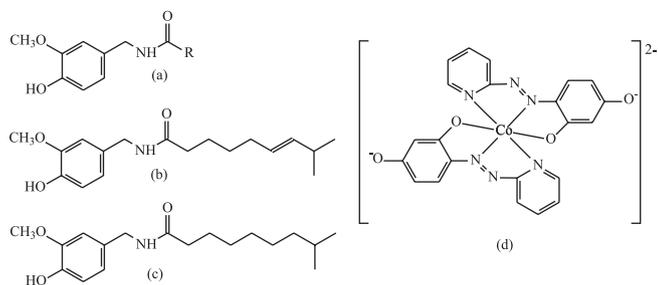


Figura 1. Estruturas moleculares a) capsaicinóides ($R =$ cadeia carbônica alifática); b) Capsaicina; c) Dihidrocapsaicina; d) Estrutura do complexo de Co(II) com PAR em solução aquosa, CoPAR_2 , de acordo com Flashka e Barnard²⁵

A composição química comum de cachaças inclui, além de água e etanol, outros componentes minoritários, como metanol, álcool isoamílico, isobutanol, propanol, acetaldeído, acetato de etila, caprilato de etila, ácido acético e dimetilssulfato.^{43,44} Optou-se pela utilização de uma cachaça de extensa comercialização nacional, com teor alcoólico de 39 % m/v e que passa por processos de uniformização de teor alcoólico e acidez, o que a torna uma opção versátil para conferir simplicidade e acessibilidade ao método proposto.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico simples para determinar CAPS totais em pimentas *Capsicum* a partir de sua reação com o complexo CoPAR_2 , a qual foi estudada para identificação da espécie cromófora gerada.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtenção dos extratos

Pimentas *in natura* sem pedúnculo, adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP e utilizadas frescas, foram fatiadas finamente com faca de aço, sem a remoção das sementes. Os extratos de CAPS foram obtidos utilizando 30 g da pimenta fatiada e 50 mL de cachaça (Pirassununga 51[®], 39 % m/v), misturados em um erlenmeyer e levados a agitação durante 30 min em mesa de agitação (Nova Técnica, CT-145). Posteriormente realizava-se a filtração simples com papel qualitativo (J. Prolab, gramatura 80 g/m² e espessura 205 μm), seguindo-se repouso por 10 min para garantir a uniformidade da extração, que ainda ocorre durante a filtração. O resíduo sólido da massa de pimenta era descartado e o extrato filtrado era armazenado em frasco de vidro âmbar. Este procedimento foi escolhido após o teste de outros solventes extratores, inclusive etanol 39 % v/v (proporção da cachaça), com o qual foram obtidos resultados análogos, indicados pelos espectros eletrônicos dos extratos. Considerando-se a possibilidade de obtenção dos extratos em cachaça, comum entre consumidores de pimentas, optou-se pelo uso desse solvente para os testes de desenvolvimento do método espectrofotométrico, que pode ser adaptado para aplicação com o solvente desejado, com a devida construção da curva analítica, nas respectivas condições reacionais, como é sempre indispensável.

Desenvolvimento do método espectrofotométrico

Estudo das condições de reação entre CoPAR_2 com CAPS

Nesta etapa, realizou-se um estudo da influência de CAPS na complexação de CoPAR_2 , utilizando diferentes tampões como solvente majoritário. Diluiu-se o extrato em tampão na proporção extrato:tampão 80:20 v/v, denominada solução estoque de CAPS, da qual foram adicionados 0,00; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 e 7,50 mL em misturas contendo as concentrações finais de $C_{\text{PAR}} = 2,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{\text{Co(II)}} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (provenientes de soluções estoque aquosa) em balões volumétricos de 25 mL. Para completar 7,50 mL nas soluções com volumes menores da solução estoque de CAPS, utilizou-se uma solução cachaça:tampão 80:20 v/v. O branco utilizado foi uma mistura de cachaça:tampão 24:76 v/v. Os tampões testados foram borato de pH 7,35, 8,35 e 9,04 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - 99,5\%$ Merck, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 99,9\%$ Sigma e $\text{NaCl} - 99,5\%$ Sigma).

Posteriormente, testou-se a mistura de $C_{\text{PAR}} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{Co(II)}} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{\text{CAPS}} = 14,35 \text{ mg L}^{-1}$ com solvente majoritário sendo a cachaça. O branco utilizado foi aguardente:água 92:8 v/v (água deionizada, obtida por osmose reversa, Gehaka).

Buscou-se, também, o ajuste da concentração de CoPAR_2 para medidas de absorbância. Foram obtidas misturas em proporção molar 2:1 de PAR (99,98% Merck) e Co(II) (CoSO_4 99,5% Merck), em cachaça:água 92:8 v/v, com diferentes concentrações de PAR e Co(II).

Os espectros eletrônicos foram registrados entre 200 e 800 nm em espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000, usando cubetas de quartzo (Q4-Biocel) com 1,0 cm de caminho óptico. Realizaram-se duplicatas da leitura e triplicata do preparo das misturas.

Estudo da espécie cromófora

Para investigar a existência de uma espécie cromófora obtida a partir da mistura de CAPS com CoPAR_2 , foram preparadas em balões

volumétricos de 25 mL misturas de soluções de CAPS + PAR + Co(II) e de PAR + Co(II), em cachaça:água 92:8 v/v, com as seguintes concentrações finais $C_{PAR} = 6,21 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{Co(II)} = 3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{CAPS} = 1 \times 10^{-5}$ e $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em triplicata. Posteriormente 5,00 mL de cada mistura foram extraídos com 25,00 mL de álcool isoamílico (99,5% Synth) em funil de separação de 100 mL. Os espectros eletrônicos das misturas iniciais e dos respectivos extratos em álcool isoamílico foram registrados em duplicata, utilizando-se os respectivos solventes, cachaça:água 92:8 v/v ou álcool isoamílico, como branco.

Para avaliar a proporção estequiométrica da espécie cromófora gerada a partir da mistura de CAPS com $CoPAR_2$ em cachaça:água 92:8 v/v, com máximo de absorvância em 510 nm, aplicou-se o método das variações contínuas.⁴⁵ Para familiarização com o método, foi confirmada a proporção do complexo de Co(II) com PAR em cachaça:água 92:8 v/v, fixando-se a soma ($C_{PAR} + C_{Co(II)}$) em três valores $1,91 \times 10^{-5}$, $3,84 \times 10^{-5}$ e $9,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para verificar a proporção da espécie colorimétrica formada entre CAPS, PAR e Co(II) em cachaça:água 92:8 v/v, fixou-se a soma ($C_{CAPS} + C_{CoPAR_2}$) nos valores: $(1,03, 1,34 \text{ e } 1,93) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para cada mistura obtida em triplicata, foram realizadas medidas de absorvância em duplicata, utilizando-se como branco o solvente das misturas reacionais, cachaça:água 92:8 v/v.

Curva analítica

Para a construção da curva analítica, foram preparadas triplicatas de misturas de Co(II), PAR e CAPS com as seguintes concentrações finais: $C_{CAPS} = 0,18$ a $358,80 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{Co(II)} = 3,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ obtidos pela adição de volumes adequados das soluções individuais em balões de 25,00 mL, utilizando como solvente cachaça:água 92:8 v/v e extrato de pimenta dedo de moça contendo $478,40 \pm 17,94 \text{ mg L}^{-1}$ de CAPS quantificado por HPLC, como padrão de CAPS, visando reduzir o eventual efeito de interferentes. Medidas de absorvância foram realizadas em duplicatas, utilizando-se como branco, o solvente das misturas reacionais, cachaça:água 92:8 v/v.

Método cromatográfico

Para quantificar CAPS por HPLC com detecção UV, foi utilizado padrão de DHCAP (~90% - Sigma®) e foram ajustadas condições para que a área dos picos das amostras atingissem 8% da área do cromatograma do padrão (solução $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de DHCAP em metanol), conforme recomendado, utilizando-se 1000 mg de extrato de pimenta a ser quantificada em cachaça:água 92:8 v/v, completando-se o volume de 10,00 mL com metanol. Seguindo-se as condições do método oficial,⁴¹ os cromatogramas foram obtidos utilizando-se coluna C18 (3,9 mmx30 cm, 10 μm , $\mu\text{Bondapak Waters}$), fase móvel: metanol : ácido acético 2 % m/v (metanol grau HPLC – Tedia® e ácido acético glacial, PA – Synth®) na proporção 56 : 44 v/v, diluição isocrática, vazão 2 mL min^{-1} e detecção em 280 nm num cromatógrafo Shimadzu Prominence, modelo SPD-M20A, com detector de arranjo de diodos, com a injeção, em duplicata, de alíquotas de 10 μL de cada triplicata das amostras preparadas.

Em cromatogramas de padrão de CAP, há três picos correspondentes a nordihidrocapsaicina (NDHCAP), capsaicina (CAP) e dihidrocapsaicina (DHCAP) nos seguintes tempos de retenção relativos 0,9; 1,0 e 1,6, respectivamente. Buscou-se estabelecer uma relação matemática para quantificar CAPS totais pelo método HPLC, utilizando-se padrão de DHCAP. Para isso, foram determinadas as composições de CAPS neste padrão e em amostras de pimenta dedo de moça e pimenta de cheiro do Pará, a partir dos dados de seus espectros de massas obtidos por UHPLC-MS, os quais foram relacionados com os cromatogramas das mesmas amostras por HPLC. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro UHPLC-MS,

modelo Acquity - triplo quadrupolo - TQD - Waters, utilizando-se coluna C18 (50x2,1mm, 1,7 μm , Acquity - UPLC®BEH – Waters), fase móvel água:acetonitrila (acetonitrila grau HPLC – Tedia®) 50:50 v/v, vazão $0,350 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção 5 μL , voltagem de capilar 0,8 kV, cone 25 V, câmara de colisão 10 V, temperatura de dessolvatação $350 \text{ }^\circ\text{C}$, vazão do gás do cone 100 L h^{-1} , vazão do gás de dessolvatação 800 L h^{-1} . O equipamento foi operado no modo MS/MS, com o primeiro quadrupolo no modo estático para as massas isotópicas dos principais CAPS, com fragmentação na câmara de colisão e análise dos fragmentos no segundo quadrupolo para comparar perfil de fragmentação e identidade dos íons moleculares em estudo. As amostras foram diluídas com ácido fórmico (ácido fórmico PA 85% - Synth®) 0,1% em água : acetonitrila 50 : 50 v/v.

Quantificação de CAPS em pimentas *Capsicum*

Determinou-se a concentração de CAPS em pimenta biquinho, pimenta *mushroom*, pimenta de cheiro do Pará e pimenta malagueta, adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP e utilizadas frescas, aplicando-se o método espectrofotométrico ($C_{CAPS/VIS}$) e o método HPLC ($C_{CAPS/HPLC}$). Foram utilizados extratos devidamente diluídos de acordo com a necessidade, com medidas espectrofotométricas e injeção cromatográfica em duplicata para cada uma das triplicatas de amostras preparadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Método espectrofotométrico

Observa-se na Figura 2 que com o aumento da C_{CAPS} ocorre decréscimo da absorvância em 510 nm e aumento da absorvância em 420 nm. Estes comportamentos indicaram que CAPS pode influenciar na complexação PAR-Co(II). As alterações das absorvâncias em 420 e 510 nm para CAPS-PAR-Co(II) seguem tendência linear (coeficientes de regressão iguais a 0,9811 e 0,9934, respectivamente) e estão ilustradas na Figura 1S (material suplementar).

Como opção para simplificar o sistema reacional, substituiu-se a solução tampão por aguardente como solvente majoritário. Os perfis espectrais obtidos estão ilustrados na Figura 3, na qual se observa o máximo de absorvância em 510 nm para a mistura de Co(II), PAR e CAPS.

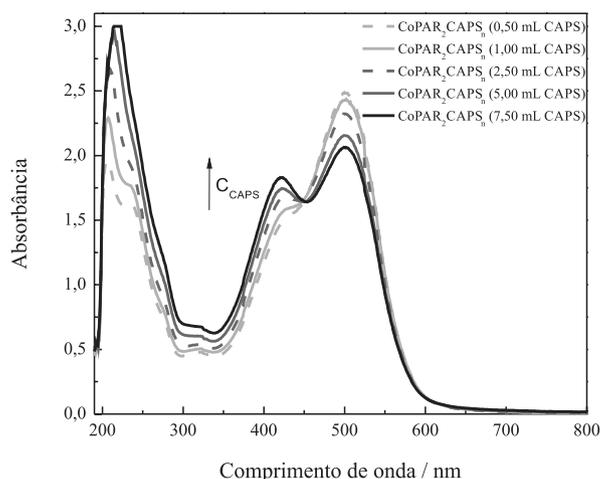


Figura 2. Espectros das misturas CAPS+PAR+Co(II) em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{Co(II)} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $V_{CAPS} = 0, 0,5, 1, 2,5, 5$ e $7,5 \text{ mL}$ de extrato de pimenta dedo de moça diluído no tampão de trabalho na proporção de 80:20 v/v. O branco utilizado foi cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 24:76 v/v

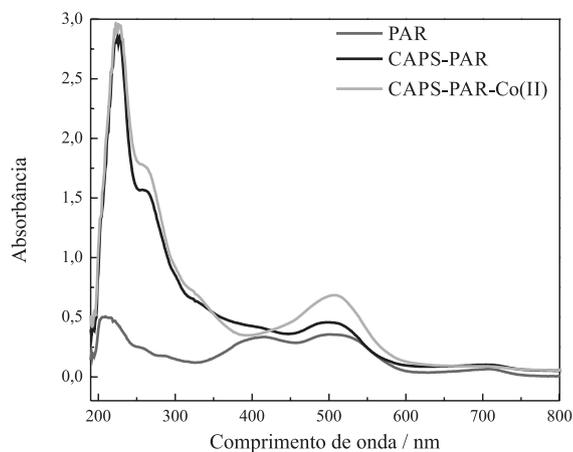


Figura 3. Espectros das misturas de $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{Co(II)} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{CAPS} = 14,35 \text{ mg L}^{-1}$. O branco utilizado foi mistura cachaça:água 92:8 v/v

A Figura 2S (material suplementar) ilustra a variação da absorbância em 510 nm do produto de interação da mistura de Co(II), PAR e CAPS que é diretamente proporcional à concentração de CAPS entre 7,18 e 28,70 mg L^{-1} (coeficiente de correlação linear = 0,9671). Embora o valor do coeficiente de correlação linear seja menor com dados da solução com cachaça, optou-se por apresentá-lo para ilustrar ser comparável ao valor gerado pelos dados obtidos a partir de dados obtidos a partir da mistura dos solventes. Sob as mesmas condições, para uma faixa de concentração de CAPS entre 0,60 e 17,94 mg L^{-1} , o coeficiente de correlação linear = 0,9996 supera esses. Esses resultados apontaram a viabilidade da simplificação da proposta com o uso de aguardente como solvente majoritário.

Embora diversas aplicações analíticas dos complexos de PAR requeiram o controle do pH de reação, nas diversas condições estudadas, controlando-se o pH com diferentes tampões, não foi observada diferença significativa nos resultados obtidos. Assim, considerando-se a simplicidade de procedimento, optou-se pela dispensa de tamponamento para a mistura reacional do método analítico desenvolvido.

Concentração dos reagentes

Inicialmente foi estudada a variação da C_{PAR} e $C_{Co(II)}$ para encontrar um limite máximo de concentração com garantia da presença desses reagentes, que devem estar em excesso quando comparado com C_{CAPS} , sem, contudo, atingir absorbâncias muito elevadas e, desta forma, favorecer a resposta que envolve a influência de CAPS na reação CoPAR_2 .

Os espectros eletrônicos das misturas estudadas com diferentes concentrações de PAR e Co(II) estão apresentados na Figura 3S (material suplementar). Para garantir a presença de CoPAR_2 em excesso suficiente para reagir com CAPS das amostras e obter absorbância máxima variando até 1,5, optou-se pela mistura contendo $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{Co(II)} = 3,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para construção de curva analítica com medidas em $\lambda_{\text{máx}} = 510 \text{ nm}$. Considerando-se a detectabilidade inerente à espectrofotometria, nos níveis de concentrações estabelecidos, eventuais efeitos espectrais devidos a componentes minoritários da cachaça ou das demais soluções não representam contribuição significativa na absorbância em 510 nm, considerada nos cálculos de concentração de CAPS.

Estudo da espécie cromófora

Buscando-se indícios da formação de uma nova espécie a partir da mistura de soluções de Co(II) (em água), PAR (em água) e CAPS (em cachaça), foram avaliados os espectros eletrônicos das misturas

dessas soluções e seus extratos em álcool isoamílico, apresentados na Figura 4. Nota-se nos espectros que houve deslocamento do máximo de absorbância da mistura de 510 nm, em cachaça:água 92:8 v/v, para 520 nm, em álcool isoamílico, como ocorre com o espectro de uma espécie definida em diferentes solventes.

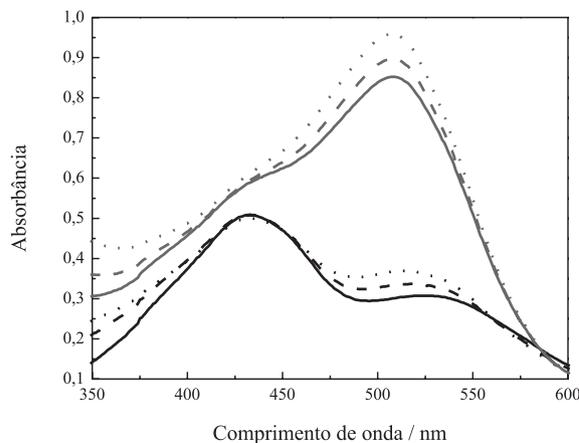


Figura 4. Espectros eletrônicos de CoPAR_2 e $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, em cachaça (cinza) e em álcool isoamílico (preto). As concentrações finais em solução de $C_{PAR} = 6,21 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $C_{Co(II)} = 3,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Onde: CoPAR_2 (—); $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, sendo $C_{CAPS} = 1 \times 10^{-5}$ (---) e $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, sendo $C_{CAPS} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (...). O branco utilizado foi o respectivo solvente, álcool isoamílico ou uma mistura cachaça:água 92:8 v/v, de acordo com o solvente da amostra considerada

Os gráficos de Jobs⁴⁵ que trazem os resultados da determinação da proporção estequiométrica das espécies resultantes da mistura de soluções de Co(II) e PAR (em cachaça:água 92:8 v/v) e da mistura de soluções de Co(II), PAR e CAPS (em cachaça:água 92:8 v/v) são apresentados nas Figuras 5a e 5b respectivamente, construídas com os valores de absorbância 510 nm, que é o comprimento de onda de máxima absorção do complexo CoPAR_2 . Na Figura 5a, nota-se que houve absorção máxima para a fração molar de Co(II) = 0,35, confirmando a proporção estequiométrica de CoPAR_2 , indicada pela literatura, o que indicou a adequação do procedimento utilizado para essa determinação. Na Figura 5b, onde são apresentados os resultados para a mistura de Co(II), PAR e CAPS, a máxima absorbância foi observada para a fração molar de CAPS = 0,65, o que indica que a razão molar entre CAPS : PAR : Co(II) é 2:2:1, sugerindo a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$.

Com o indicativo de formação da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ em solução a partir da mistura de Co(II), PAR e CAPS, sua absorvidade molar (ϵ) em cachaça:água 92:8 v/v e em álcool isoamílico foi estimada com a Equação 1, resultando $(1,4 \pm 0,6) \times 10^5$ e $(5,2 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

$$\epsilon = \frac{A_{\lambda_{\text{máx}}}}{b \times 0,5 \times C_{CAPS}} \quad (1)$$

onde: A = absorbância, sendo $\lambda_{\text{máx}} = 510 \text{ nm}$ para cachaça e 520 nm para álcool isoamílico; b = caminho óptico (1 cm) e C_{CAPS} = concentração de CAPS (mol L^{-1}).

Os resultados obtidos apontam a existência da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, formada pela interação do complexo CoPAR_2 com CAPS, pois o aumento de absorbância entre 510 e 520 nm é proporcional à C_{CAPS} para ambos os solventes, sugerindo tratar-se, portanto, da mesma espécie cromófora. Além disso, esses resultados apontam a viabilidade do uso de outro solvente, além de cachaça, para a obtenção dos dados.

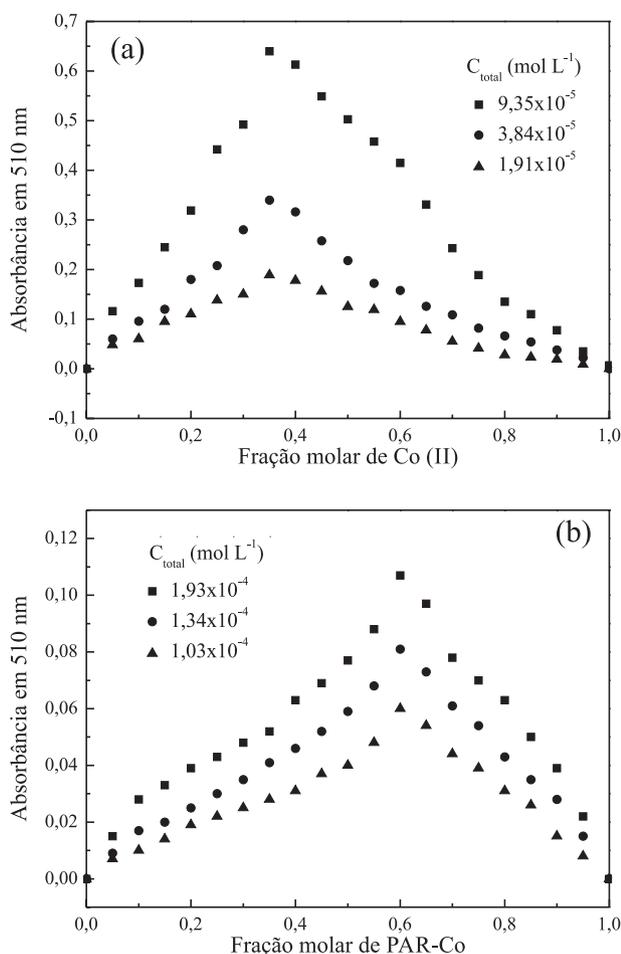


Figura 5. Gráficos de Jobs para determinação da estequiometria das espécies formadas pela interação de Co(II) e PAR (a) e Co(II), PAR e CAPS (b) obtidos pelo método da variação contínua. Em (a) $C_{total} = C_{PAR} + C_{Co(II)}$. Em (b) $C_{total} = C_{Co(II)} + C_{CAPS}$. O branco utilizado foi uma mistura de cachaça:água 92:8 v/v

Curva analítica

Nos espectros das misturas de PAR, Co(II) e CAPS, utilizando cachaça:água 92:8 v/v como solvente, apresentados na Figura 4S (material suplementar), a absorbância em 510 nm (A) é proporcional a C_{CAPS} . Com esses dados foi construída uma curva analítica descrita por $A = 0,90 + 6,63 \times C_{CAPS}$, com resposta linear entre 0,60 e 17,94 mg L⁻¹, com coeficiente de regressão linear = 0,9996. Os valores de limite de detecção e limite de quantificação encontrados foram iguais a 0,0004 e 0,001 mg de CAPS/g de pimenta, respectivamente. Para a determinação em triplicata de 10 diluições independentes de um extrato de pimenta dedo de moça, encontrou-se um desvio padrão médio relativo igual a 4%.

Tabela 1. Dados de espectros de massas (MS/MS) de amostras contendo CAPS

Nome	Razão massa carga m/z	Solução de padrão de DHCAP	Extrato de pimenta dedo de moça	Extrato de pimenta de cheiro do Pará
Capsaicina	306	presente	presente	presente
Dihidrocapsaicina	308	presente	não detectado	presente
Norcapsaicina	292	não detectado	não detectado	não detectado
Nornorcapsaicina	278	não detectado	não detectado	não detectado
Nordihidrocapsaicina	294	presente	presente	não detectado
Nornordihidrocapsaicina	280	não detectado	não detectado	não detectado
Homocapsaicina	320	presente	presente	não detectado
Homodihidrocapsaicina	322	não detectado	presente	presente

Método cromatográfico

Os dados dos espectros de massas obtidos por UHPLC-MS estão sistematizados na Tabela 1. Pode ser notado que nem sempre CAP, DHCAP e NDHCAP estão presentes nas pimentas. Além disso, outros CAPS não previstos pelo método oficial podem ser encontrados, como pode ser observado a partir das informações dos espectros de massas da Figura 6, que comprovam a presença do fragmento 137 m/z, comum na fragmentação dos íons moleculares de CAPS. Na

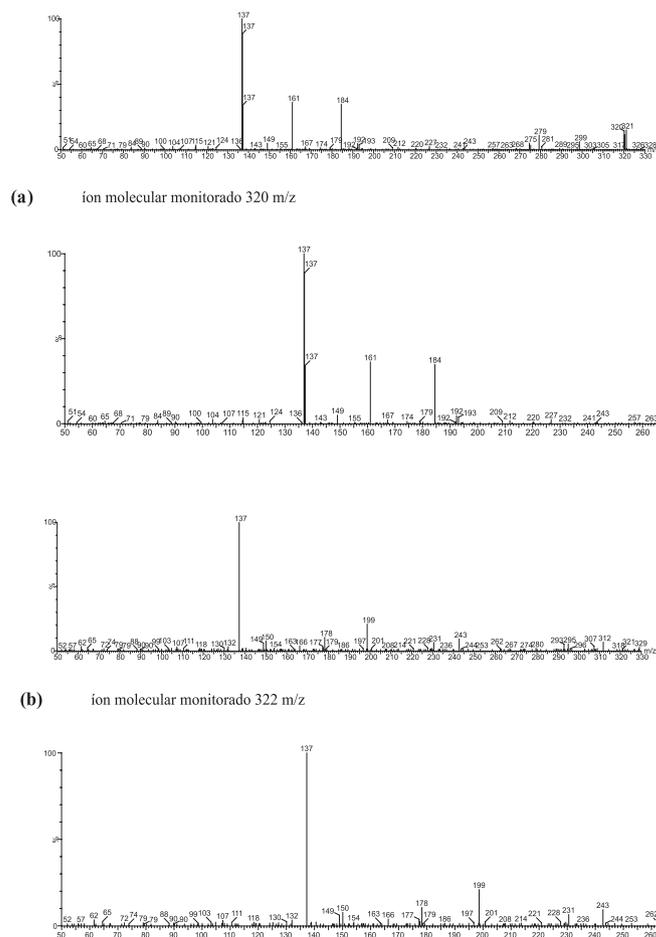


Figura 6. Espectros de massas (MS/MS no modo positivo) da fragmentação de alguns íons moleculares de CAPS relacionados na Tabela 1. a) fragmentos do íon 320 m/z (HCAP) da solução padrão de DHCAP, onde foram identificados DHCAP (308 m/z), CAP(306 m/z), NDHCAP (294 m/z) e HCAP (320 m/z). b) fragmentos do íon 322 m/z (HDHCAP) da solução de extrato de pimenta dedo de moça, onde foram identificados CAP (306 m/z), NDHCAP (294 m/z), HCAP (320 m/z) e HDHCAP (322 m/z)

Figura 7, os cromatogramas obtidos por HPLC das mesmas amostras demonstram que há coeluição dos CAPS.

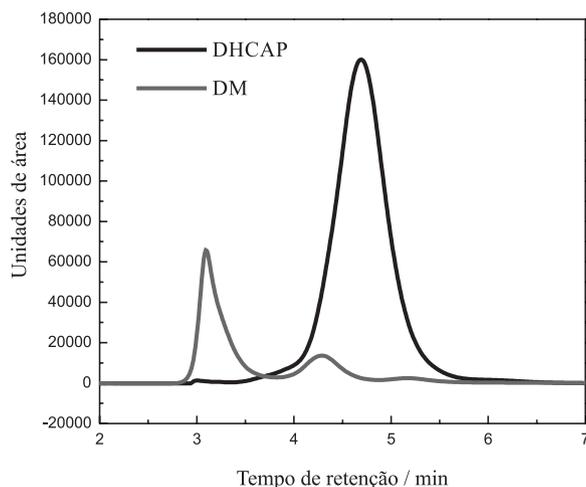


Figura 7. Cromatogramas do padrão de DHCAP 0,5 mg mL⁻¹, extrato de pimenta dedo de moça (DM)

Considerando as adaptações realizadas no método por HPLC para uso de DHCAP como padrão e a massa da alíquota do extrato de 1000 mg usada no preparo da amostra, o cálculo de C_{CAPS} totais pelo método HPLC em mg CAPS/g pimenta segue a Equação 2.

$$C_{CAPS} = \frac{C_{PD} \times S_{AM} \times V_B \times m_{EXT}}{S_{PD} \times m_{ALIQ} \times m_{PIM}} \quad (2)$$

sendo: C_{PD} = concentração do padrão de DHCAP (mg mL⁻¹); S_{AM} = soma das áreas dos picos do cromatograma da amostra (entre 2 e 7 min); S_{PD} = soma das áreas dos picos do cromatograma do padrão; V_B = volume do balão de preparo da amostra; m_{EXT} = massa do extrato obtido (g); m_{ALIQ} = massa da alíquota de extrato utilizada no preparo da amostra (g) e m_{PIM} = massa de pimenta utilizada para obtenção do extrato (g).

Os resultados de quantificação de CAPS em algumas amostras frescas de *Capsicum*, obtidos pelo método espectrofotométrico (C_{CAPS/VIS}) e pelo método HPLC (C_{CAPS/HPLC}) estão descritos na Tabela 2. Para os testes F e t, conforme recomendado por Skoog *et al.*⁴⁶ e Bacchan *et al.*,⁴⁷ com nível de confiança de 95%, devem ser considerados os seguintes valores F_{crítico} = 5,05 e t_{crítico} = 2,57. Aplicando-se os testes F e t aos dados da Tabela 2 foram encontrados valores de F_{calculado} e t_{calculado} menores que os correspondentes valores críticos, indicando que não há diferença significativa entre os resultados de C_{CAPS/VIS} e C_{CAPS/HPLC}.

Tabela 2. Concentração de CAPS em extratos de pimentas *Capsicum*. Representação das médias de seis replicatas ± estimativa de desvio padrão

Pimenta	C _{CAPS VIS} (mg CAPS / g pimenta)	C _{CAPS HPLC} (mg CAPS / g pimenta)	F _{calculado} *	t _{calculado} *
Biquinho	0,09±0,01	0,10±0,01	1,00	-0,88
Mushroom	0,63±0,02	0,60±0,01	0,52	0,89
Pimenta de cheiro do Pará	1,27±0,04	1,23±0,03	1,89	1,01
Malagueta	1,32±0,02	1,30±0,01	1,23	0,90

*F_{crítico} = 5,05 e t_{crítico} = 2,57, com 95% de confiança.^{46,47}

CONCLUSÕES

O método desenvolvido neste trabalho pode ser considerado uma

alternativa viável para a determinação de CAPS totais em extratos etanólicos de pimentas *Capsicum*, uma vez que apresentou precisão, baixo custo, rapidez, simplicidade e seletividade adequada para aplicação neste tipo de amostra. Algumas dessas características podem estimular o interesse por sua aplicação para a classificação dos níveis de picância de diferentes *Capsicum*, o que agrega valor aos produtos muitas vezes comercializados indistintamente em cooperativas de pequenos produtores.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S à 4S estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida para o trabalho de mestrado que gerou este trabalho e pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC Compendium of Chemical Terminology - the Gold Book. <http://old.iupac.org/goldbook/A00220.pdf>, acessada em Fevereiro 2014.
- Amaral, L.; *A Química – 50 Palavras*; Loyola: São Paulo, **1995**.
- De, A. K.; *Capsicum: The genus Capsicum*; Manirakiza, P.; Covaci, A.; Schepens, P., eds.; *Pungency principles in Capsicum, analytical determinations and toxicology*; Taylor & Francis: London, **2003**.
- Zewdie, Y.; Bosland, P. W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 161.
- Vasconcelos, C.; *Pimentas que você encontra em São Paulo*; Editora do Autor: São Paulo, **2011**.
- Carvalho, S. I. C.; Bianchetti, L. B.; Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; *Pimentas do gênero Capsicum no Brasil*, Embrapa Hortaliças: Brasília, **2006**.
- Pelt, Jean-Marie, *Especiarias e ervas aromáticas: história, botânica e culinária*; tradução André Telles; Jorge Zahar: Rio de Janeiro, **1933**.
- Macrae, R.; *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition (Peppers and Chillies)*; Macrae, R.; Robinson, R. K.; Sadler, M. J., eds.; Academic Press: London, **1993**.
- Govindarajan, V. S.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1986**, *24*, 245.
- Vesaluoma, M.; Müller, L.; Gallar, J.; Lambiase, A.; Moilanen, J.; Hack, T.; Belmonte, C.; Tervo, T.; *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2000**, *41*, 2138.
- Huang, J.; Mabury, S. A.; Sagebiel, J. C.; *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 1630.
- Kirschbaum-titze, P.; Hiepler, C.; Mueller-seitz, E.; Petz, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1260.
- Contreras-padilla, M.; Yahia, E. M.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2075.
- Perucka, I.; Oleszek, W.; *Food Chem.* **2000**, *71*, 287.
- Korel, F.; Bagdatlioglu, N.; Balaban, M. O.; Hisil, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3257.
- Karnka, R.; Rayanakorn, M.; Watanesk, S.; Vaneesorn, Y.; *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 661.
- Barbero, G. F.; Liazid, A.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *Talanta* **2008**, *75*, 1332.
- Boonkird, S.; Phisalaphong, C.; Phisalaphong, M.; *Ultrason. Sonochem.* **2008**, *15*, 1075.
- Yao, J.; Nair, M. G.; Chandra, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1303.
- Peusch, M.; Müller-seitz, E.; Petz, M.; Müller, A.; Anklam, E.; *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. A*; **1997**, *204*, 351.
- Daood, H. G.; Ille's, V.; Gnayfeed, M. H.; Mészáros, B.; Horváth, G.; Biacs, P.A.; *J. Supercrit. Fluids* **2002**, *23*, 143.

22. Barbero, G. F.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3231.
23. Satamaría, R. I.; Reyes-duarte, M. D.; Bázana, E.; Fernando, D.; Gama, F. M.; Mota, M.; López-munguía, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3063.
24. Salgado-roman, M.; Botello-álvarez, E.; Rico-martínez, R.; Jiménez-islas, H.; Cárdenas-manríquez, M.; Naverrete-bolaños, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1012.
25. Barbero, G. F.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *578*, 227.
26. Kosuge, S.; Furuta, M.; *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 248.
27. Ting, S. V.; Barrons, K. C.; *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1942**, *40*, 504.
28. North, H.; Bayonne, N. J.; *Anal. Chem.* **1949**, *21*, 934.
29. Bajaj, K. L.; Kaur, G.; *Microchim. Acta* **1979**, *1*, 81.
30. Bajaj, K. L.; *J. AOAC Int.* **1980**, *63*, 1314.
31. Ayad, M. M.; Khayyal, S. E.; Farag, N. M.; *Anal. Lett.* **1985**, *18*, 793.
32. Yanying, Z.; *Hebeisheng Kexueyuan Xuebao* **1988**, *33*, 1.
33. Anan, T.; Ito, H.; Matsunaga, H.; Monma, S.; *Capsicum and Eggplant Newsletter* **1996**, *16*, 61.
34. Mandal, S.; Poonam, S.; Hore, D. K.; *Indian Journal of Plant Genetic Resources* **1998**, *11*, 213.
35. Manirakiza, P.; Covaci, A.; Schepens, P.; *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 1399.
36. Iwai, K.; Suzuki, T.; Fujiwake, H.; Oha, S.; *J. Chromatogr. A* **1979**, *172*, 303.
37. Krajewska, A. M.; Powers, J. J.; *J. AOAC Int.* **1987**, *70*, 926.
38. Peña-Alvarez, A.; Ramírez-Maya, E.; Alvarado-Suárez, L. A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2843.
39. Cooper, T. H.; Guzinski, J. A.; Fisher, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 2253.
40. Kozukue, N.; Han, J.; Kozukue, E.; Lee, S.; Kim, J.; Lee, K.; Levin, C. E.; Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9172.
41. The United States Pharmacopeia (USP 28), 28th revision and The National Formulary (NF 23)”, 23th edition; CRC Press: New York, **2005**.
42. Flaschka, H. A.; Barnard, Jr. A. J.; *Chelates in Analytical Chemistry – A collection of Monographs*; Marcel Dekker: New York, **1972**.
43. Bogusz Jr., S.; Ketzer, D. C. M.; Gubert, R.; Andrades, L.; Gobo, A. B.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 793.
44. Nascimento, R.F.; Cardoso, D.R.; Lima-Neto, B.S.; Franco, D.W. e Faria, J.B.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 735.
45. Siroki, M.; Maric, Z.; Stefanac, M.; Herak; *Anal. Chim. Acta* **1975**, *75*, 101.
46. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*; Cengage Learning: São Paulo, **2011**.
47. Baccan, N.; Andrade J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S.; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 3ª ed., Edgard Blucher: São Paulo, **2003**.