

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LETÍCIA MELO RODRIGUES

**VERIFICAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O TEOR DE CAPSAICINA E
DIHIDROCAPSAICINA E A PUNGÊNCIA EM PIMENTAS DO GÊNERO
*CAPSICUM***

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LETÍCIA MELO RODRIGUES

**VERIFICAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O TEOR DE CAPSAICINA E
DIHIDROCAPSAICINA E A PUNGÊNCIA EM PIMENTAS DO GÊNERO
*CAPSICUM***

Trabalho de Conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de conclusão de curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato
Orientadora

Porto Alegre, 2015

Dedico este trabalho às pessoas mais relevantes da minha vida: meu pai, minha mãe, meu irmão e ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve presente apesar da distância que nos separa: À minha mãe que me deu suporte e orientação para alcançar meus objetivos por mais difíceis que fossem, a meu pai que sempre me incentivou a estudar e que sei que tem muito orgulho de mim por ter me tornado a pessoa que sou. Ao meu irmão que sempre foi um ótimo companheiro e por quem eu tenho grande admiração.

Agradeço ao meu marido, Matheus, pelo amor, amizade, companheirismo e compreensão durante toda essa jornada dupla de universidade e trabalho.

Agradeço aos meus amigos que tiveram a compreensão nos momentos que não pude estar presente e entenderam que tive de abdicar de muitas atividades para atualmente estar alcançando alguns objetivos.

Um agradecimento especial à minha orientadora, a Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pizzolato pela atenção e paciência dispensadas a mim durante esse momento de trabalho de conclusão de curso que não é trivial a nenhum formando.

Agradeço à Souza Cruz pela oportunidade de me desenvolver e ter contato com técnicas analíticas instrumentais que jamais imaginaria obter antes de concluir um curso de graduação.

RESUMO

A capsaicina e a dihidrocapsaicina são os principais capsaicinóides que conferem pungência às pimentas do gênero *Capsicum* possuindo inúmeras variedades. O teor de capsaicinóides é o principal critério para a avaliação da qualidade das diversas variedades do fruto. Dos catorze capsaicinóides já encontrados, os de maior ocorrência nos frutos são a capsaicina e dihidrocapsaicina, sendo a capsaicina o componente predominante (cerca de 70%) seguido da dihidrocapsaicina (cerca de 20%), motivo da importância da otimização de métodos de extração e análise que qualifiquem e quantifiquem esses compostos. A grande maioria dos métodos encontrados na literatura que utilizam a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas com o objetivo de qualificar e/ou quantificar os capsaicinóides aplicam extrações que dispendem de muito tempo para ocorrer e/ou necessitam de um grande volume de solventes. O presente trabalho divide-se em duas etapas: comparar a eficiência de extração por soxhlet, baseando-se em dados da literatura, com o método de extração por ultrassom visando significativa redução da massa de amostra necessária, tempo de extração, volume de solvente e conseqüentemente os custos envolvidos na extração dos capsaicinóides, bem como verificar a relação de pungência dos frutos com a concentração de capsaicina e dihidrocapsaicina presentes através da comparação por metodologias sensoriais existentes. Após a retirada dos analitos de interesse dos frutos através das duas técnicas de extração anteriormente mencionadas, o extrato foi analisado pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Constatou-se que é possível obter a mesma quantidade de capsaicinóides pela técnica de extração assistida por ultrassom quando comparado à técnica de extração por Soxhlet e que existe uma relação diretamente proporcional entre a ardência característica dos frutos com o teor de capsaicina.

Palavras-chave: Capsaicinóides. Capsaicina. Dihidrocapsaicina. Alcalóides. Pimentas. Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Constituintes do fruto da pimenteira.....	13
Figura 2 - Estruturas dos principais capsaicinóides presentes nas pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	15
Figura 3 - Estrutura molecular da molécula da vanilina.....	16
Figura 4 - Escala Scoville Organoleptic Teste ou “Termômetro SHU” do ardume para pimentas brasileiras.	17
Figura 5 - Figura ilustrativa da escala de Julie Cohn.....	18
Figura 6 - Esquema de um sistema Soxhlet convencional.....	19
Figura 7 - Esquema geral de um Cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas.....	24
Figura 8 - Pico base e íon molecular da capsaicina	26
Figura 9 - Pico base e íon molecular da dihidrocapsaicina	26
Figura 10 - Fluxograma representando as etapas do processo de extração por Soxhlet.	29
Figura 11 - Espectro de massas utilizado como referência do composto capsaicina.	31
Figura 12 - Espectro experimental do suposto pico do composto capsaicina.	31
Figura 13 -Espectro de massas utilizado como referência do composto dihidrocapsaicina.....	32
Figura 14 - Espectro experimental do suposto pico do composto dihidrocapsaicina.....	32
Figura 15 - Cromatograma do íon extraído para o pico tentativamente identificado como capsaicina.....	33
Figura 16 - Cromatograma do íon extraído para o pico tentativamente identificado como dihidrocapsaicina.....	33
Figura 17 - Cromatogramas dos extratos obtidos por Soxhlet da pimenta Malagueta	35
Figura 18 - Cromatogramas da extração assistida por ultrassom mais semelhante à extração por Soxhlet.	37
Figura 19 - Fluxograma do procedimento de extração por Soxhlet à esquerda e fluxograma do procedimento definido por extração assistida por ultrassom à direita.	39

Figura 20 - Gráfico contendo as áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina em relação a diversas pimentas analisadas.....	41
Figura 21 - Comparação entre a escala organoléptica SHU e as respostas das somas das áreas dos capsaicinóides.....	42
Figura 22 - Comparação entre a escala organoléptica SHU e as respostas das áreas da capsaicina.	43
Figura 23 - Cromatograma da pimenta Malagueta pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	44
Figura 24 - Cromatograma da pimenta Cumari-do-Pará pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	44
Figura 25 - Cromatograma da pimenta de Bico ou biquinho pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	45
Figura 26 - Cromatograma da pimenta Dedo-de-Moça pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	45
Figura 27 - Cromatograma da pimenta Calabresa pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	46
Figura 28 - Cromatograma da pimenta Murupi pela metodologia de extração assistida por ultrassom.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes realizados para a metodologia que utiliza a extração assistida por ultrassom.....	30
Tabela 2 - Áreas dos cromatogramas da pimenta Malagueta pela metodologia de extração por Soxhlet.	35
Tabela 3 - Áreas dos primeiros testes utilizando o método de extração assistida por ultrassom.....	36
Tabela 4 - Áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina dos cromatogramas da pimenta Malagueta pela metodologia de extração por Soxhlet utilizando uma massa de 100 mg e tempo de extração de 3 minutos.....	38
Tabela 5 - Áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina de todas as pimentas extraídas pela técnica de extração assistida por ultrassom e a soma das áreas desses compostos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EI – Ionização Eletrônica, do inglês Electron Ionization

CI – Ionização Química, do inglês Chemical Ionization

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

m/z – razão massa-carga

IUPAC- International Union of Pure and applied Chemistry

SPME- Microextração em fase sólida, do inglês: *solid phase microextraction*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Espécies de pimentas do gênero capsicum e utilizações.....	13
2.2 A química dos capsaicinóides	15
2.3 Técnicas sensoriais para avaliação da pungência de pimentas capsicum.....	16
3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO MAIS UTILIZADAS PARA CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS	19
3.1 Técnica de extração por soxhlet convencional.....	19
3.2 Técnica de extração assistida por ultrassom.....	20
4 TÉCNICAS ANALÍTICAS MAIS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS	212
4.1 Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas.....	22
4.1.1 <i>Fragmentação no espectrômetro de massas</i>	25
5 OBJETIVO	27
5.1 Objetivo geral	27
5.2 Objetivos específicos	27
6 METODOLOGIA	28
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
7.1 Confirmação dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina.....	31
7.2 Comparação dos métodos de extração por Soxhlet e assistida por ultrassom. ..	34
7.3 Verificação da relação entre áreas de capsaicina e dihidrocapsaicina e pungência características das pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	39
8 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS NO MODO SCAN DE AQUISIÇÃO DE DADOS PARA OS CAPSAICINÓIDES	52

1 INTRODUÇÃO

Pimentas do gênero *Capsicum* têm sido utilizadas de inúmeras formas por diferentes culturas humanas ao redor do planeta. Este gênero pode ser associado à medicina tradicional humana, ao extermínio de enfermidades em criações domésticas, ou até em ritos de passagem que destaquem bravura de jovens guerreiros indígenas. Contudo, as pimentas do gênero *Capsicum* são mais relacionadas a produtos condimentares que dão sabor e cheiro a diferentes pratos na culinária mundial. Isso é devido a alguns alcalóides, os capsaicinóides, contidos nos frutos que na maior parte das vezes conferem ao alimento uma sensação organoléptica de pungência. A palavra *Capsicum* tem origem na palavra grega “*Kapto*”, que significa “picar”, e pimenta, no latim “*pigmentum*”, que significa corante.

As pimentas são utilizadas para a produção de condimentos, pois possuem características como cor dos frutos e aroma que atraem os consumidores. A produção desse fruto também alcança o âmbito social, devido à grande necessidade de mão-de-obra, em especial durante a colheita. Além disso, o mercado de pimenta abrange a comercialização de frutos para consumo in natura e conservas caseiras até a exportação de páprica, pó de pimentão ou pimenta doce madura vermelha. Os frutos de pimentas picantes podem ser desidratados e comercializados inteiros, em flocos (calabresa) e em pó (páprica picante) ou, ainda, em conservas e em molhos líquidos.

As perspectivas e as potencialidades do mercado de pimentas são praticamente ilimitadas pela versatilidade de suas aplicações culinárias, industriais e ornamentais. As pimentas do gênero *Capsicum* são cultivadas praticamente no mundo todo, sendo grandes produtores China, Tailândia, Coreia do Sul, Índia, Japão, México, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Espanha, Romênia, Bulgária, Hungria, Grécia, Ucrânia, Turquia, a antiga Iugoslávia, Gana, Nigéria, Egito, Tunísia e Argélia. No Brasil, estima-se que são cultivados anualmente 2.000 hectares com pimentas em todas as regiões brasileiras, destinadas aos mais diversos usos.

Dentre os catorze capsaicinóides encontrados nas pimentas do gênero *Capsicum*, a capsaicina é o de maior ocorrência nos frutos, sendo o maior responsável pelo ardor característico do fruto. Em seguida, a dihidrocapsaicina é o segundo maior responsável pela ardência, sendo que esses dois alcalóides quando somados são responsáveis por cerca de 90% do total de capsaicinóides do fruto.

Este trabalho tem como objetivo comparar a eficiência de extração pelo método de Soxhlet, baseando-se em dados da literatura, com o método de extração por ultrassom visando significativa redução da massa de amostra necessária, tempo de extração, volume de solvente e conseqüentemente os custos envolvidos na extração dos capsaicinóides e verificar a relação de pungência dos frutos com a concentração de capsaicina e dihidrocapsaicina presentes através da comparação por metodologias sensoriais existentes.

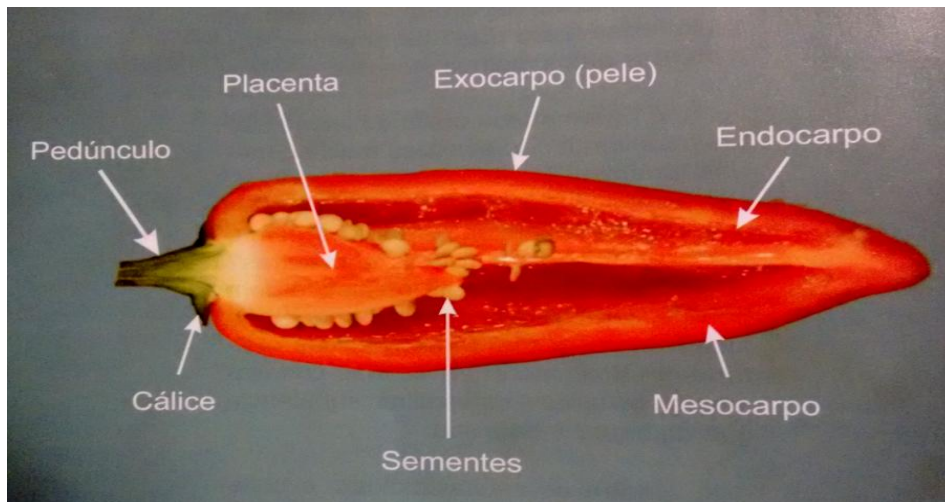
Atualmente, diversas técnicas analíticas instrumentais são utilizadas para qualificação e/ou quantificação dos capsaicinóides. Porém, nesse projeto será utilizada a técnica de cromatografia gasosa para análise, devido ao seu excelente desempenho de separação para matrizes complexas, acoplada à espectrometria de massas, um detector universal com alta sensibilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies de pimentas do gênero capsicum e utilizações

A capsaicina se acumula na superfície da placenta (tecido localizado na parte interna do fruto), sendo liberada quando o fruto sofre algum dano físico segundo Ribeiro et al. (2008, p. 26). As sementes não são fonte de capsaicinóides, mas devido à proximidade com a placenta absorvem estes compostos e também conferem sensação de ardência de acordo com Ribeiro et al. (2008, p. 35).

Figura 1 - Constituintes do fruto da pimenteira.



Fonte: RIBEIRO et al., 2008.

As espécies de pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae. Dentre as espécies do gênero *Capsicum*, cinco são domesticadas e largamente cultivadas e utilizadas pela espécie humana que são elas: *Capsicum annuum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens*. Destas, apenas *C. pubescens* não é cultivada no Brasil de acordo com Reiiischneider (2000).

Segundo Reiiischneider (2000), o gênero *Capsicum annuum* é a espécie mais cultivada e inclui as variedades mais comuns do gênero, como pimentões, pimentas doces e algumas pimentas ornamentais. As *Capsicum baccatum*, representadas pelas pimentas dedo-de-moça, cambuci e chapéu-de-frade, são os tipos mais comuns e cultivados no Brasil. As *Capsicum chinense*, a mais brasileira das

domesticadas, tem como tipos mais conhecidos, pimenta-de-cheiro, biquinho, pimenta-de-bode e murupi. *Capsicum frutescens* inclui as famosas pimentas malaguetas, que são extremamente picantes.

O composto capsaicina não possui somente relevância no setor de alimentação ao conferir características picantes quando pimentas do gênero *Capsicum* são adicionadas aos alimentos. Este alcalóide também é um composto com caráter vasodilatador que tem sido utilizado pela indústria farmacêutica na composição de medicamentos para uma diversidade de condições neuropáticas de dor, que incluem neuralgia pós-terapêutica, neuropatia diabética dolorosa, osteoartrite, dor crônica pós- cirurgia e síndrome Guillan- Barré segundo Marcovitz e Guilhar (1997) e Szallasi e Blumberg (1999). Outros estudos tem relatado efeitos anti-carcinogênicos, cessando o ciclo celular e induzindo a apoptose in vitro em diversos cânceres humanos de acordo com Surh (2002).

Conforme Binshatok, Bean e Woolf (2007), outras pesquisas também revelam que a capsaicina atua seletivamente, direcionando a ação de anestésicos para neurônios sensíveis à dor, não atingindo outras células neurológicas. Além dessas propriedades farmacêuticas, a capsaicina também possui antioxidantes naturais como a Vitamina C, E e os carotenóides segundo Ribeiro et al. (2008, p. 32-34).

Segundo Kasbia (2005), o consumo de pimentas do gênero *Capsicum* atua na liberação de endorfinas que são mediadores químicos cerebrais responsáveis pelo bem-estar e pela regulação do humor, induzindo o sistema nervoso à liberação de catecolaminas resultando numa diminuição do apetite e conseqüente menor ingestão de alimentos calóricos.

A capsaicina também é comumente utilizada na indústria armamentista na fabricação de *sprays* de pimentas que causam temporária incapacitação, produzindo irritação sensorial onde a capsaicina é o composto responsável por causar a irritação nos olhos, nariz e trato respiratório (mucosas). Atualmente, esses *sprays* são muito utilizados como um meio de auto-defesa e embora jatos de *sprays* de pimentas causem muito desconforto, incluindo paralisias por vários minutos, não deixam sequelas. Contudo, é contraditório que a capsaicina, um composto que provoca dor seja utilizado para a cura de doenças que causem dores como artrite. Essa característica do composto é porque a exposição da capsaicina a tecidos menos sensíveis reduz a sensibilidade à dor segundo Ribeiro et al. (2008, p. 27).

2.2 A química dos capsaicinóides

O capsaicinóide principal que há nas pimentas do gênero *Capsicum* é a capsaicina, seguido de outros principais capsaicinóides. A capsaicina e a dihidrocapsaicina juntas são responsáveis por aproximadamente 90% dos capsaicinóides que há no fruto da pimenta e são os capsaicinóides mais potentes que conferem o ardor característico do fruto e suas moléculas diferem somente na saturação do grupo acila segundo Zewdie e Bosland (2001). Na figura 2 estão ilustrados os principais capsaicinóides.

Figura 2 - Nome e estrutura química dos principais capsaicinóides presentes nas pimentas do gênero *Capsicum*.

Composto	Grupo R	Estrutura comum	Composto	Grupo R
Nornorcapsaicina			Nornordihidrocapsaicina	
Norcapsaicina			Nordihidrocapsaicina	
Capsaicina			Dihidrocapsaicina	
Homocapsaicina			Homodihidrocapsaicina	

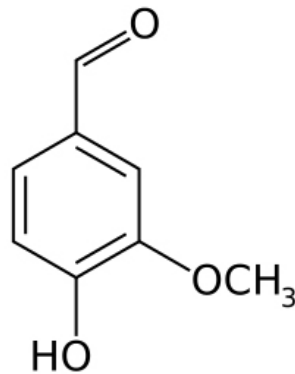
Fonte: SOUZA, 2012.

A maioria dos alcalóides são heterocíclicos que, além do carbono, hidrogênio e nitrogênio, podem conter oxigênio, enxofre e raramente outros elementos como o cloro, bromo e fósforo. Os capsaicinóides são alcalóides que apresentam um anel aromático homocíclico, um grupo hidroxila fenólico, um grupo metóxi na posição orto em relação à hidroxila e uma cadeia alifática.

O ardor da capsaicina e dihidrocapsaicina é atribuído à presença do grupo funcional amida (vanilamida) e uma cadeia alifática saturada ou insaturada. Constatam-se esses argumentos quando se observa a molécula de vanilina (figura 3) que possui, igualmente à capsaicina e dihidrocapsaicina, um grupo hidroxila

fenólico e um grupo metóxi na posição orto em relação à hidroxila, porém a vanilina não possui nenhum ardor característico segundo Kulka (1967) e Iwai et al.,(1979).

Figura 3 - Estrutura química da molécula de vanilina.



Os capsaicinóides possuem heteroátomos de nitrogênio. A capsaicina e a dihidrocapsaicina são sólidos cristalinos, lipofílicos, incolores e inodoros cujas fórmulas moleculares e pesos moleculares são respectivamente $C_{18}H_{27}NO_3$ e 305.4 g/mol, $C_{18}H_{29}NO_3$ e 307.4 g/mol. Os nomes IUPAC destes compostos são respectivamente (N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-E-6-nonenamida) e (N-[(4-hidroxi-3-metóxfenil)metil]-8-metil-E-6-nonaamida) sendo solúveis em gorduras, cetonas, álcoois e óleos. A capsaicina pode apresentar isomeria cis e trans por conter uma dupla ligação que permite uma rotação interna, porém a capsaicina é sempre encontrada na forma trans, pois na forma cis a cadeia fica tensionada, tornando essa configuração menos estável. Dessa maneira, o isômero trans é sempre mais estável que o cis. Já a dihidrocapsaicina não possui isomeria cis e trans de acordo com Reyes-Escogido, Gonzalez-Mondragon e Vazquez-Tzompantzi (2011).

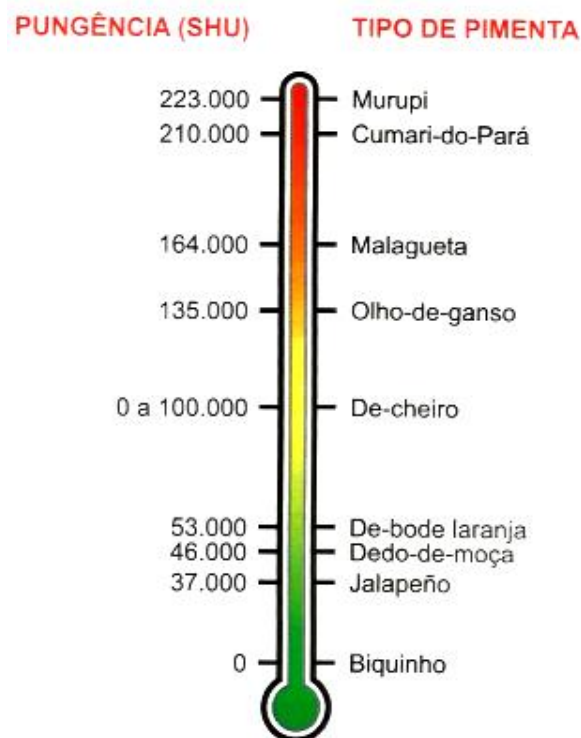
2.3 Técnicas sensoriais para avaliação da pungência de pimentas *Capsicum*

Destacam-se entre os métodos sensoriais para avaliação da picância nas diversas pimentas do gênero *Capsicum* o Método Scoville Organoleptic Teste, conhecido como escala SHU.

Segundo Ribeiro et al. (2008, p. 27), em 1912, o farmacologista americano Wilbur L. Scoville desenvolveu uma metodologia para determinar o grau de

pungência de diversas variedades de pimentas *Capsicum*. Atualmente, este teste é realizado por cinco pessoas treinadas que analisam uma solução obtida a partir de uma massa conhecida de pimentas maceradas em álcool e diluídas com água. Quanto maior o ardor da amostra, maior a necessidade de diluição, até que a picância deixe de ser sentida pelo avaliador. Dessa maneira, se é necessário uma diluição de 1000 unidades de água para que não se sinta a picância, a amostra é avaliada com uma pungência de 1000 Unidades Scoville (SHU). Apesar de o teste apresentar muita subjetividade quando avaliado a variação de provador, esta metodologia é considerada a mais aceita para determinar sensorialmente a ardência de pimentas.

Figura 4 – Representação esquemática da Escala Scoville Organoleptic Teste ou “Termômetro SHU” do ardume para pimentas brasileiras.

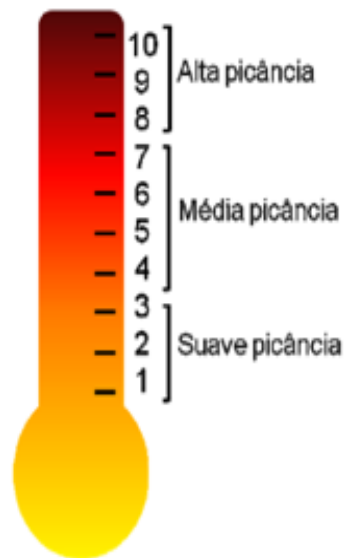


Fonte: RIBEIRO et al., 2008.

Outra escala para determinar a picância nas pimentas é conhecida como escala de temperatura desenvolvida por Julie Cohn, onde as pimentas tem seu ardor

classificado de 1 a 10. Os graus 1,2 e 3 indicam as pimentas mais suaves, os graus 4, 5, 6 e 7 indicam as espécies de média pungência, enquanto que os graus 8, 9 e 10 são dedicados às pimentas de elevada pungência conforme Linguanotto Neto (2004). A figura 5 ilustra essa escala de temperatura.

Figura 5 - Figura ilustrativa da escala de Julie Cohn.



Fonte: LINGUANOTTO NETO, 2004.

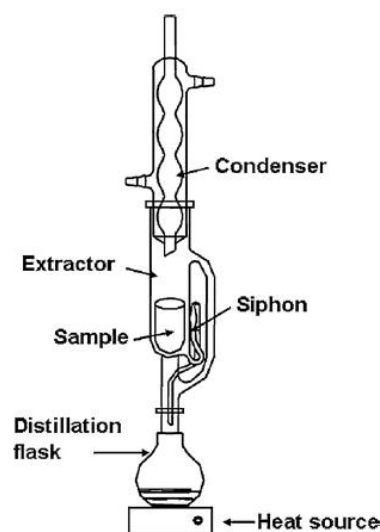
3 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO MAIS UTILIZADAS PARA CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS

De acordo com a bibliografia são diversas técnicas utilizadas para a extração dos capsaicinóides do fruto da pimenteira, entre eles citam-se a extração por Soxhlet e a SPME (do inglês: *solid phase microextraction*) segundo Peña- Alvarez, Ramírez-Maia e Alvarado- Suárez (2009), extração por maceração de acordo com Choi et al (2006), extração por agitação mecânica como menciona Contreras-Padilla e Yahia (1998), extração líquido-líquido segundo Kaale, Schepdael, Roets e Hoogmartens (2002), extração por ultrassom como expressam Peña-Alvarez, Alvarado e Vera-Avila (2012), extração assistida por microondas de acordo com Barbero, Palma e Barroso (2006) e extração por fluido supercrítico como citam Daood et al. (2002).

3.1 Técnica de extração por soxhlet convencional

Em 1879 Von Soxhlet desenvolveu um novo sistema de extração que se baseia no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente devido à sifonagem e posterior condensação do solvente aquecido dentro do balão que está posicionado na base do aparelho como ilustra a figura 6. Os processos que ocorrem neste tipo de extração são exclusivamente físicos, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química.

Figura 6 - Esquema de um sistema Soxhlet convencional.



Fonte: CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010.

As vantagens que o método de Soxhlet apresenta são que a amostra está sempre em contato com o solvente, a temperatura do sistema permanece alta, devido ao calor aplicado manter-se relativamente constante. É uma metodologia simples que não requer um treinamento especializado e permite a retirada de uma quantidade maior de óleo quando comparado a outras metodologias.

Porém, a metodologia por Soxhlet apresenta diversas desvantagens, tais como: algumas amostras requerem cuidados específicos para a obtenção da fração lipídica devido à possibilidade de oxidação afetando a qualidade final da extração, utilização de grandes volumes de solventes gerando uma quantidade significativa de resíduos, o tempo que amostra necessita ficar exposta ao refluxo de solvente é na maioria das vezes muito longo.

Contudo, a centenária técnica de extração por Soxhlet ainda é referência para o desenvolvimento ou validação de outras técnicas de extração. As vantagens e desvantagens da técnica tem sido parâmetro para uma série de otimizações no que se refere à extração dos analitos de interesse em diversas matrizes.

3.2 Técnica de extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é uma alternativa para o preparo de amostras, sendo um procedimento simples, rápido e que, geralmente, não requer operador especializado.

Os banhos de ultrassom consistem no acoplamento de um ou mais cristais piezelétricos na parte inferior de um vaso metálico. Aplicando uma diferença de potencial nas faces laterais de um transdutor piezelétrico, são provocadas vibrações nas faces perpendiculares do dispositivo, e este vibrará a uma frequência pré-determinada (20 e 40 kHz).

As ondas ultra-sônicas são ondas mecânicas com frequências maiores que as audíveis para o ser humano, ou seja, acima de 16 KHz e se propagam através da matéria, com uma velocidade que pode variar desde centenas de metros por segundo no ar, até milhares de metros por segundo em sólidos. Na água e em soluções aquosas diluídas, sua velocidade é da ordem de 1500 m/s. A descoberta do ultrassom ocorreu em 1880, por Pierre e Jacques Curie, quando estudavam o efeito piezoelétrico, que consiste na variação das dimensões físicas de certos cristais e cerâmicas quando são submetidos a campos elétricos.

A aplicação de ondas ultra-sônicas gera o fenômeno da cavitação que é um termo associado à formação de bolhas ou cavidades, cujo colapso implosivo vem acompanhado de enorme turbulência. A dimensão das bolhas é muito pequena em relação ao volume total de líquido, de modo que o calor que produzem é rapidamente dissipado sem alteração apreciável no ambiente.

Os fundamentos para aplicação do ultrassom, nesses processos, estão relacionados às ondas de choque, resultantes da aplicação do campo acústico sobre um meio material. Essas ondas acentuam a interação entre a fase líquida e a superfície dos sólidos, aumentando a concentração das espécies presentes na fase líquida.

As ondas ultra-sônicas consistem de ciclos de compressão e expansão. Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva sobre o líquido, juntando as moléculas, enquanto os ciclos de expansão exercem uma pressão negativa, afastando as moléculas umas das outras.

A técnica de extração assistida por ultrassom vem demonstrando enormes vantagens frente a outras técnicas. Essa técnica requer menor tempo de extração, massa reduzida de amostra para a análise e necessita de menor volume de solventes, o que reduz os resíduos gerados nas análises que utilizam a técnica de extração como alternativa.

4 TÉCNICAS ANALÍTICAS MAIS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS

Inúmeros são os métodos colorimétricos para a quantificação de capsaicina onde é necessária a adição de reagentes para gerar produtos como cita Bajaj e Kaur (1978). Os métodos colorimétricos, de modo geral, apresentam dificuldades relacionadas com diversos interferentes, reprodução de resultados e com a estabilidade de reagentes cromóforos.

A quantificação da capsaicina também ocorre por técnicas instrumentais mais sofisticadas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas segundo Peña-Alvarez, Ramíres-Maia e Alvarado-Suarez (2009), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas conforme Reilly et al. (2001), cromatografia líquida com auxílio de detector ultravioleta como relata Chinn, Shivappa e Cotter (2011) e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID) de acordo com Cisneros-Pineda et al. (2007).

4.1 Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas

A cromatografia gasosa é um método que se baseia nas diferentes distribuições dos componentes da amostra entre uma fase estacionária (a coluna cromatográfica) e uma fase móvel (gás de arraste). É uma técnica com um poder de resolução excelente e baixos limites de detecção. Além disso, é uma excelente técnica quantitativa para concentrações que variam de picogramas a miligramas.

A fase estacionária empregada pode ser de colunas recheadas e colunas capilares, sendo que as colunas recheadas são constituídas por tubos de vidro, aço inox, ou raramente de cobre com diâmetros que variam de 1 a 4 mm e recheadas com uma fase sólida ou líquida. As colunas capilares são preparadas com capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 0,10 a 0,75 mm.

A cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido e cromatografia gás-líquido.

Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com uma grande área superficial e os mecanismos de separação se baseiam em adsorção das substâncias nesse sólido. No entanto, na cromatografia gás-líquido a fase estacionária é um líquido pouco volátil, imobilizado em um suporte sólido ou em

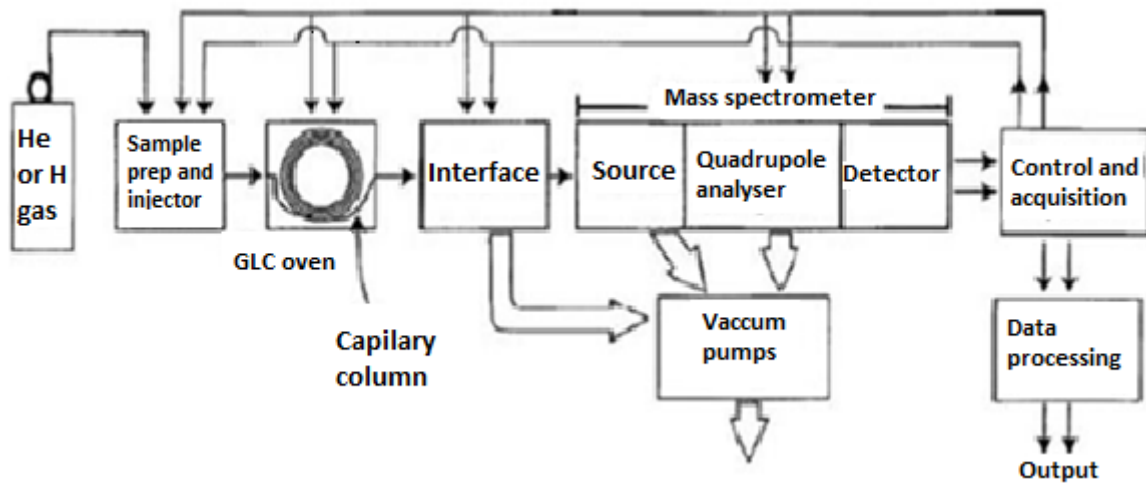
paredes de colunas capilares e a separação fundamenta-se em mecanismos de partição dos componentes da amostra entre a fase líquida e a fase gasosa. A grande maioria das utilizações da técnica de cromatografia gasosa corresponde à cromatografia gás-líquido totalizando em torno de 95% das aplicações.

Na cromatografia gasosa, a amostra a ser analisada é injetada em um cromatógrafo e as substâncias da mistura, já volatizadas, são arrastadas pela fase móvel para o interior de uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação da amostra em componentes de acordo com a afinidade destes compostos com a coluna cromatográfica. Dessa maneira, componentes que possuem maior afinidade pela fase estacionária ficam mais tempo retidos, resultando em um maior tempo de retenção do analito. Ao contrário, compostos que possuem menor afinidade pela fase estacionária ficam menos tempo retidos, ocasionando num menor tempo de retenção. Após a eluição dos componentes da coluna cromatográfica, estes são analisados por um detector.

O espectrômetro de massas é responsável por identificar os componentes da amostra e o sinal gerado quando a amostra passa por ele após eluir da coluna cromatográfica é registrado graficamente.

O acoplamento da cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas (GC-MS) é uma combinação de duas excelentes técnicas analíticas: a cromatografia gasosa por apresentar uma alta eficiência de separação de misturas complexas e a espectrometria de massas pela capacidade de confirmação de compostos, bem como pela identificação de compostos desconhecidos devido às informações estruturais fornecidas pelas fragmentações das moléculas. Além disso, a espectrometria de massas oferece um aumento considerável da sensibilidade. A figura 7 ilustra um esquema de um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas.

Figura 7 - Esquema geral de um Cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas.



Fonte: AMARAL, 2009.

No momento em que os componentes da amostra chegam ao detector, este se encontra em alto vácuo e as moléculas são ionizadas em uma fonte de íons que possui um filamento incandescente. A ionização pode ocorrer de duas maneiras: por ionização química (CI – Chemical Ionization) ou por impacto de elétrons (EI – Electron Impact) que corresponde à técnica de ionização amplamente utilizada. No modo CI, um gás ionizante, como por exemplo, o metano, o isobutano ou amônia são geralmente utilizados para ionizar as moléculas positivamente ou negativamente, fornecendo uma ionização mais suave fazendo com que a molécula fragmente-se menos. No modo EI as moléculas são bombardeadas por um feixe de elétrons (normalmente 70 eV) provenientes de um filamento incandescente, sendo que esse tipo de ionização fornece fragmentos de moléculas carregados positivamente.

Para a realização deste trabalho utilizou-se a ionização por impacto de elétrons e após as espécies serem ionizadas pelo filamento incandescente elas foram aceleradas e focalizadas por um conjunto de lentes até um filtro de massas denominado quadrupolo. O quadrupolo é responsável por criar um campo eletromagnético que filtra algumas massas determinadas pelo operador ou aplica um campo eletromagnético que permite que todas as massas presentes na amostra sejam visualizadas.

O modo em que o quadrupolo permite que somente algumas massas sejam detectadas é chamado de modo SIM (Selected Ion Monitoring). Quando as massas selecionadas chegam ao detector, o quadrupolo impõe um campo eletromagnético tal que permite que somente os íons selecionados prossigam para o detector e as demais massas sejam descartadas. Nesse modo, há um ganho em sensibilidade, pois o detector está analisando somente um número reduzido de massas quando comparado ao modo SCAN.

Ao contrário, no modo SCAN uma varredura de todas as massas é realizada. O campo eletromagnético é aplicado para selecionar um grande range de massas, como por exemplo, de 30 a 300 u.m.a, assim todas as massas que se encontram nesse range serão analisadas e as demais serão descartadas.

Após passarem pelo detector, os íons encontram um diodo de alta energia que transformam as moléculas positivas em elétrons e os desvia para a multiplicadora de elétrons.

A eletromultiplicadora de elétrons tem a função de multiplicar o sinal gerado pelos elétrons provenientes do diodo. O sinal multiplicado é enviado a um transdutor de sinal, gerando o fragmentograma de cada molécula que chegou ao detector. Num sistema GC-MS, todo fragmentograma estará vinculado a um cromatograma, onde cada pico corresponderá a um fragmentograma único.

Neste estudo será utilizada a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS), configurando-se o sistema para o modo de aquisição em SCAN.

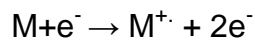
4.1.1 Fragmentação no espectrômetro de massas

Os espectros de massas das substâncias, na configuração de impacto de elétrons, são gerados pela fragmentação das moléculas devido ao impacto que sofrem com um filamento incandescente sendo ionizadas. Os íons que são gerados apresentam um grande conteúdo de energia residual interna e tendem a se decompor em fragmentos de massa/carga menores. Assim, os espectros de massas obtidos apresentam um grande número de fragmentos de íons, o que é de grande interesse para a elucidação estrutural, uma vez que estes íons são indicativos da estrutura do íon precursor e, portanto, da estrutura do composto. Todavia, os íons precursores "intactos", ou seja, que não se fragmentaram até o analisador, são

geralmente pouco intensos neste tipo de espectro, o que dificulta a determinação da massa molecular e da fórmula molecular.

Dentre os íons formados durante a fragmentação, alguns são de extrema importância para elucidação estrutural:

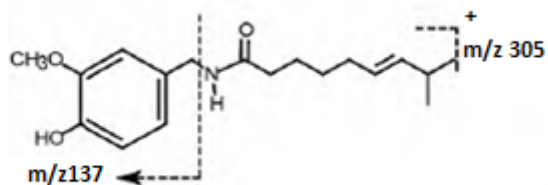
- Íon Molecular: Quando a molécula permanece intacta até a sua chegada ao detector tem-se o íon molecular, assim é o fragmento gerado pela remoção de um elétron da molécula.



- Pico base: É o fragmento mais intenso do espectro e possui a intensidade arbitrária de 100%. Geralmente, o pico base é resultado do fragmento mais estável da molécula.

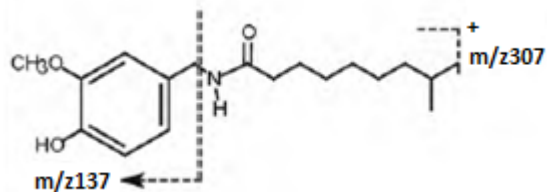
O pico base e molecular da capsaicina e dihidrocapsaicina estão representados respectivamente nas figuras 8 e 9.

Figura 8 - Pico base e íon molecular da capsaicina



Fonte: ZANGH et al., 2010.

Figura 9 - Pico base e íon molecular da dihidrocapsaicina



Fonte: ZANGH et al., 2010.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo geral

Comparar a eficiência de extração por soxhlet com o método de extração assistida por ultrassom e avaliar a relação de pungência dos frutos com a concentração de capsaicina e dihidrocapsaicina presentes nas amostras.

5.2 Objetivos específicos

Através da comparação da eficiência de extração entre o método de extração por Soxhlet convencional baseado em dados da literatura segundo Peña-Alvarez, Ramírez- Maia e Alvarado-Suárez (2009) e o método de extração assistida por ultrassom espera-se que os seguintes objetivos sejam atingidos:

- Reduzir a massa de amostra necessária para a análise;
- Reduzir o volume de solvente necessário para a extração;
- Reduzir o tempo de ensaio;
- Reduzir o número de vidrarias utilizadas para a análise;
- Verificar a relação existente entre picância de diversas pimentas e a concentração de capsaicina e dihidrocapsaicina através da comparação de áreas dos cromatogramas.

6 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do trabalho, seis amostras de pimentas do gênero *Capsicum* foram utilizadas. Selecionaram-se pimentas de diferentes picâncias, desde pimentas muito suaves até os frutos mais picantes encontrados no mercado local, a fim de verificar a equivalência entre a eficiência de extração entre as metodologias que utilizam o Soxhlet e o método que utiliza o ultrassom para a extração dos capsaicinóides dos frutos, bem como verificar se a metodologia de extração assistida por ultrassom e o método cromatográfico utilizado permitem verificar a relação existente entre pungência e o teor de capsaicina e dihidrocapsaicina. As amostras escolhidas foram:

- Pimenta A - Pimenta Malagueta- Pertencente ao gênero *Capsicum Frutescens* L.;
- Pimenta B – Pimenta Cumari- do-Pará - Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* L.var. *baccatum*;
- Pimenta C – Pimenta de Bico ou biquinho- Pertencente ao gênero *Capsicum* Chinês;
- Pimenta D - Pimenta Dedo de Moça – Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* var. *pendulum*;
- Pimenta E - Pimenta Calabresa - Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* var. *pendulum*;
- Pimenta F - Pimenta Murupi - Pertencente ao gênero *Capsicum* Chinês.

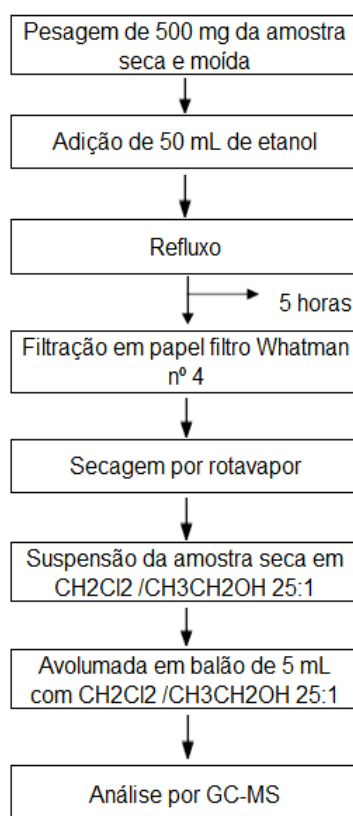
Na primeira etapa do estudo, com o intuito de atingir o objetivo de verificar se as metodologias de extração por Soxhlet e a extração por ultrassom são equivalentes optou-se por escolher uma das amostras que possui os compostos capsaicina e dihidrocapsaicina baseando-se em dados da literatura de acordo com Ribeiro et al. (2008, p. 28).

O fruto escolhido para o teste foi a Pimenta Malagueta pertencente ao gênero *Capsicum Frutescens* L.

A pimenta Malagueta foi extraída pelo método de Soxhlet e pelo método de extração assistida por ultrassom.

Para a extração por Soxhlet a amostra foi tratada conforme o procedimento da literatura descrito por Peña-Alvarez, Ramírez-Maia e Alvarado-Suárez (2009) que consiste nos seguintes passos consecutivos: secagem do fruto por 24 horas em estufa a 110°C, moagem em moinhos de bolas com uma rotação de 350 rpm por 5 minutos, pesagem de 500 mg da amostra seca e moída em um cartucho apropriado para extração por Soxhlet e adição no balão de 50mL de etanol p.a. no balão de extração. A solução foi refluxada em uma chapa de aquecimento por 5 horas em uma temperatura de 120°C. Após o resfriamento, a solução foi concentrada em um rota evaporador até a secura utilizando um banho-maria ajustado em 65°C. Posteriormente seca, a amostra foi dissolvida com CH_2Cl_2 / $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ em uma proporção de 25:1 e avolumada em um balão volumétrico de 5mL com a mesma mistura de solventes em que foi dissolvida, conforme ilustra a figura 10. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

Figura 10 - Fluxograma representando as etapas do processo de extração por Soxhlet.



Para determinar a metodologia assistida por ultrassom que mais se assemelha à eficiência de extração apresentado pelo método por Soxhlet, a pimenta Malagueta foi seca e moída da mesma maneira que para a extração por Soxhlet e testes descritos na tabela 1 foram executados em duplicata. Foi utilizado um banho de ultrassom com frequência de 47kHz.

Tabela 1 - Testes realizados para a metodologia que utiliza a extração assistida por ultrassom.

Réplica	Tempo de extração (min.)	Volume de solvente (mL)		Massa (mg)
1	6	3	6	200
2				
1	9			
2				
1	15			
2				

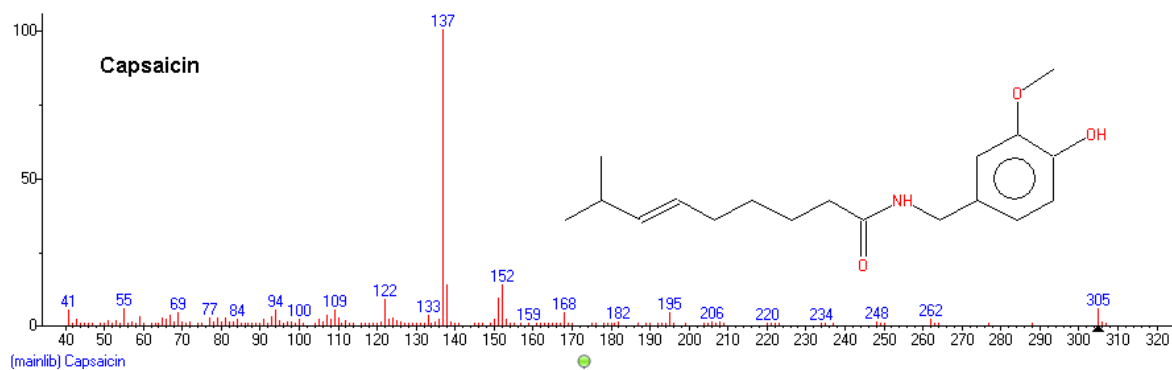
O solvente escolhido para a extração por ultrassom foi a acetona p.a. por conter menos água que o etanol, solvente utilizado na metodologia por Soxhlet. Além disso, solventes como o etanol podem danificar a fase estacionária da coluna utilizada. Os parâmetros cromatográficos encontram-se no ANEXO A.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Confirmação dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina

Para verificar se os supostos picos no cromatograma são dos analitos capsaicina e dihidrocapsaicina avaliou-se o perfil de fragmentação teórico no software Chemstation e comparou-se com os espectros dos cromatogramas gerados. Para isso, foi utilizado padrões de espectros de massas presentes na biblioteca do software do GC-MS para determinar quais os fragmentos característicos dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina.

Figura 11 – Espectro de massas utilizado como referência do composto capsaicina



Fonte: NIST.

Figura 12 - Espectro experimental do suposto pico do composto capsaicina.

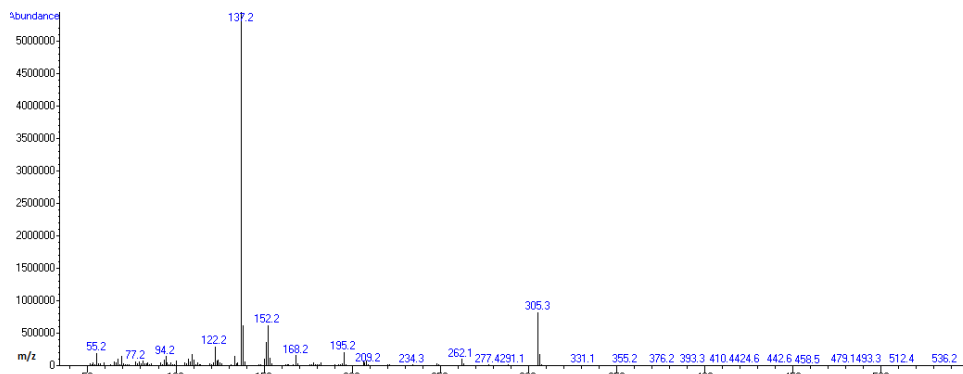
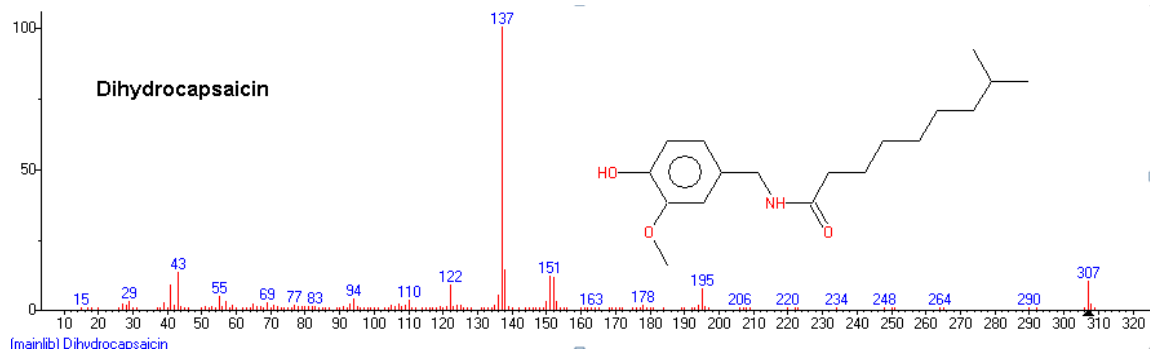
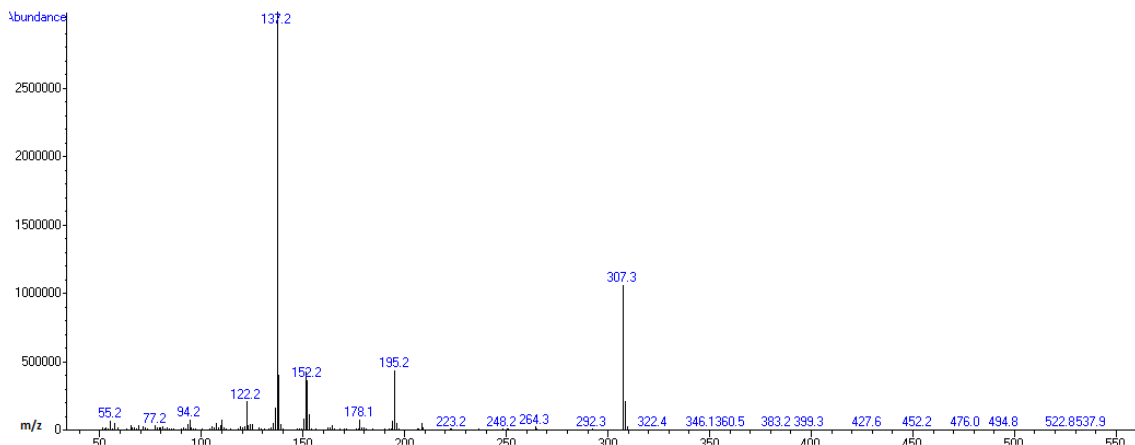


Figura 13 - Espectro de massas utilizado como referência do composto dihidrocapsaicina.



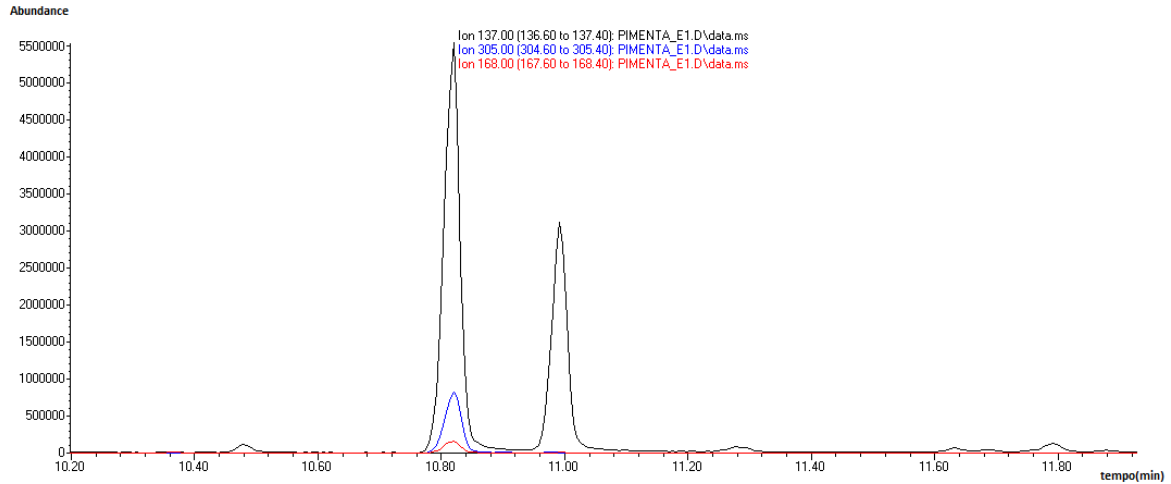
Fonte: NIST.

Figura 14 - Espectro experimental do suposto pico do composto dihidrocapsaicina.



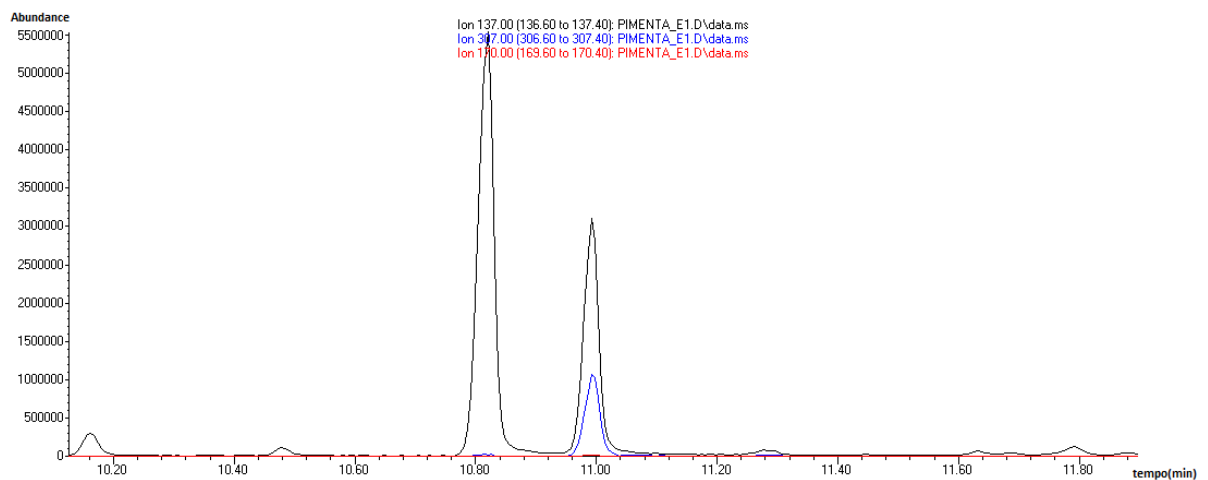
Outra forma de verificar se o composto possui a fragmentação esperada é utilizando uma ferramenta do software Chemstation de extração de íons. Pode-se escolher íons característicos da fragmentação que elucidam a estrutura do composto procurado. No caso da capsaicina fixaram-se os íons 137 (íon que representa o pico base do espectro), 305 (íon molecular) e 168 (íon resultante da subtração do íon molecular e íon do pico base).

Figura 15 - Cromatograma do íon extraído para o pico tentativamente identificado como capsaicina.



No caso da dihidrocapsaicina determinaram-se os íons 137 (íon que representa o pico base do espectro), 307 (íon molecular) e 170 (íon resultante da subtração do íon molecular e íon do pico base).

Figura 16 - Cromatograma do íon extraído para o pico tentativamente identificado como dihidrocapsaicina.



Assim, analisando as semelhanças entre os espectros experimentais e os espectros teóricos, bem como a relação diretamente proporcional entre a

abundância de cada íon extraído no software e a abundância dos íons no espectro teórico de massas pode-se afirmar que o pico no tempo de retenção de aproximadamente 10,80 minutos se refere ao composto capsaicina e no tempo de aproximadamente 11 minutos ao composto dihidrocapsaicina.

7.2 Comparação dos métodos de extração por Soxhlet e assistida por ultrassom.

Para a extração por Soxhlet a amostra foi tratada conforme o procedimento da literatura descrito por Peña- Alvarez, Ramírez- Maia e Alvarado- Suárez (2009). O procedimento de extração por Soxhlet como está descrito no artigo é um método oficial de extração de capsaicinóides em frutos do gênero *Capsicum* (AOAC 995.03) e por esse motivo os resultados gerados por essa metodologia são considerados referência para estudos de outras metodologias de extração. Dessa maneira, neste trabalho a extração descrita no método oficial será considerada 100% para os capsaicinóides, assim como os autores Peña- Alvarez, Ramírez- Maia e Alvarado- Suárez (2009) consideraram para seus estudos.

Com a finalidade de comparar a eficiência de extração do método oficial por Soxhlet (AOAC 995.03), com o método de extração assistida por ultrassom que é sugerido neste trabalho, foi escolhido uma pimenta que contém os capsaicinóides que se deseja extrair segundo Ribeiro et al. (2008, p. 28). A pimenta escolhida dentre várias foi a pimenta Malagueta. Na tabela 2 encontram-se as áreas encontradas pelo método de extração por Soxhlet e na figura 17 os cromatogramas sobrepostos das extrações em duplicata por Soxhlet.

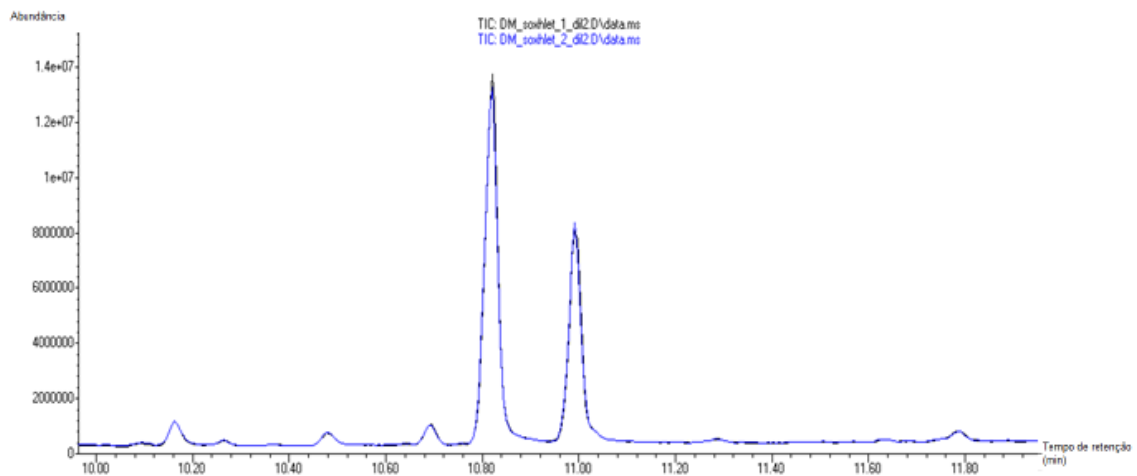
A pimenta Malagueta necessitou de diluição, pois quando injetada como foi extraída ultrapassou a escala de abundância, então foi coletado uma alíquota de 100 microlitros e avolumada a 1100 microlitros com acetona, ou seja, a pimenta foi diluída cerca de 11 vezes.

Para atingir o objetivo de comparar as diferentes metodologias de extração, todas as áreas demonstradas neste trabalho foram normalizadas. Essa normalização foi necessária devido as diferentes massas e distintos volumes de solvente utilizados nos métodos de extração.

Tabela 2 - Áreas dos compostos atribuídos como capsaicina e dihidrocapsaicina presentes no extrato da pimenta Malagueta após extração por Soxhlet.

Técnica de extração	Áreas	
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
Soxhlet	419098486	239456832
	454294380	263572714

Figura 17 - Cromatogramas dos extratos obtidos por Soxhlet da pimenta Malagueta.



Para otimizar e definir a melhor metodologia de extração assistida por ultrassom foi necessário a realização de diversos testes.

No primeiro teste realizado foi fixado uma massa de 200 miligramas da pimenta Malagueta, o volume de solvente de 3 mililitros de acetona e variou-se os tempos de ultrassom em 6, 9 e 15 minutos.

O segundo teste foi realizado da mesma maneira que o primeiro estudo excetuando-se o volume de solvente utilizado: 6 mililitros de acetona. Igualmente ao procedimento de extração por Soxhlet, os extratos originados pela extração assistida por ultrassom foram diluídos cerca de 11 vezes para que não fosse ultrapassada a escala de abundância. Na tabela 3 encontram-se o primeiro e segundo teste contendo as respectivas áreas geradas pelos cromatogramas, bem como a eficiência de extração da técnica assistida por ultrassom considerando a eficiência de extração por Soxhlet como 100%.

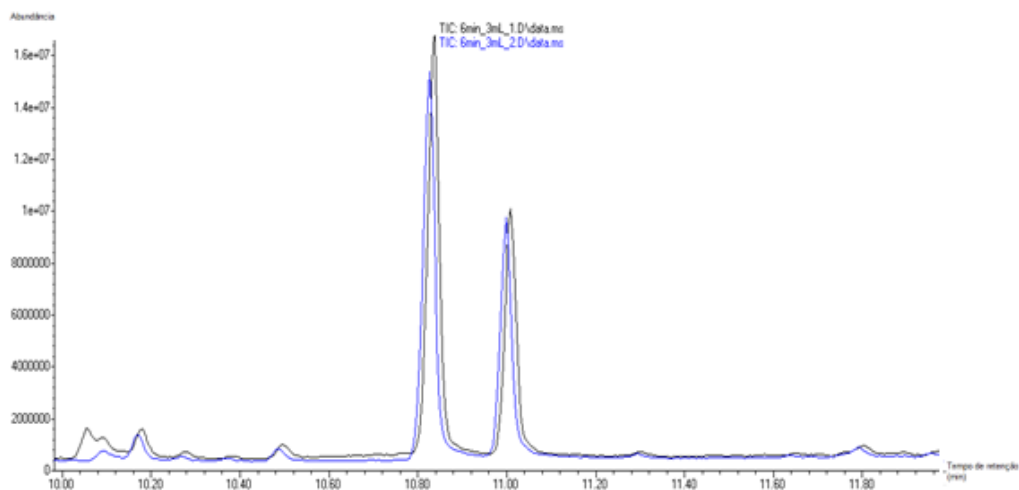
Tabela 3 - Áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina dos testes utilizando o método de extração assistida por ultrassom e a eficiência de extração em % quando comparado ao método por Soxhlet.

Tempo (minutos)	Técnica de extração	Massa de amostra (mg)	Volume de solvente (mL)	Áreas		Eficiência de extração(%)	
				Capsaicina	Dihidro capsaicina	Capsaicina	Dihidro capsaicina
6	Ultrassom	200	3	441270456	257738619	105	107
				424963846	244862908	101	102
9				390334923	229559031	93	95
				413945017	242293541	98	101
15				419654314	250679916	100	104
				516048173	299185047	123	124
6	Ultrassom	200	6	336333474	200395176	80	83
				306112268	181761014	73	75
9				334973699	190195044	79	79
				326552004	196128485	77	81
15				324424290	194646040	77	81
				297960894	172216562	71	71

Como se pode observar na tabela 3 a metodologia que se aproximou da eficiência de extração por Soxhlet foi o primeiro teste utilizando uma massa de 200 miligramas da pimenta Malagueta e 3 mililitros de solvente, bem como pode-se notar que 6 minutos de extração são suficientes para a extração dos capsaicinóides capsaicina e dihidrocapsaicina.

Abaixo pode-se observar na figura 18 os cromatogramas da extração em duplicata da metodologia que se definiu como a mais apropriada que consiste na pesagem de 200mg de pimenta, adição de 3 mL de acetona e 6 minutos de extração por ultrassom.

Figura 18 - Cromatogramas da extração assistida por ultrassom mais semelhante à extração por Soxhlet.



Com o intuito de diminuir a massa necessária para a análise e o tempo de extração, foram realizados outros testes utilizando uma massa de 100 mg e um tempo de ultrassom de 3 minutos. Esses extratos sofreram o mesmo processo de diluição dos testes anteriores. Na tabela 4 o teste é ilustrado com suas respectivas áreas e eficiências de extração em relação ao método de extração por Soxhlet.

Tabela 4 - Áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina dos cromatogramas da pimenta Malagueta pela metodologia de extração por Soxhlet utilizando uma massa de 100 mg e tempo de extração de 3 minutos.

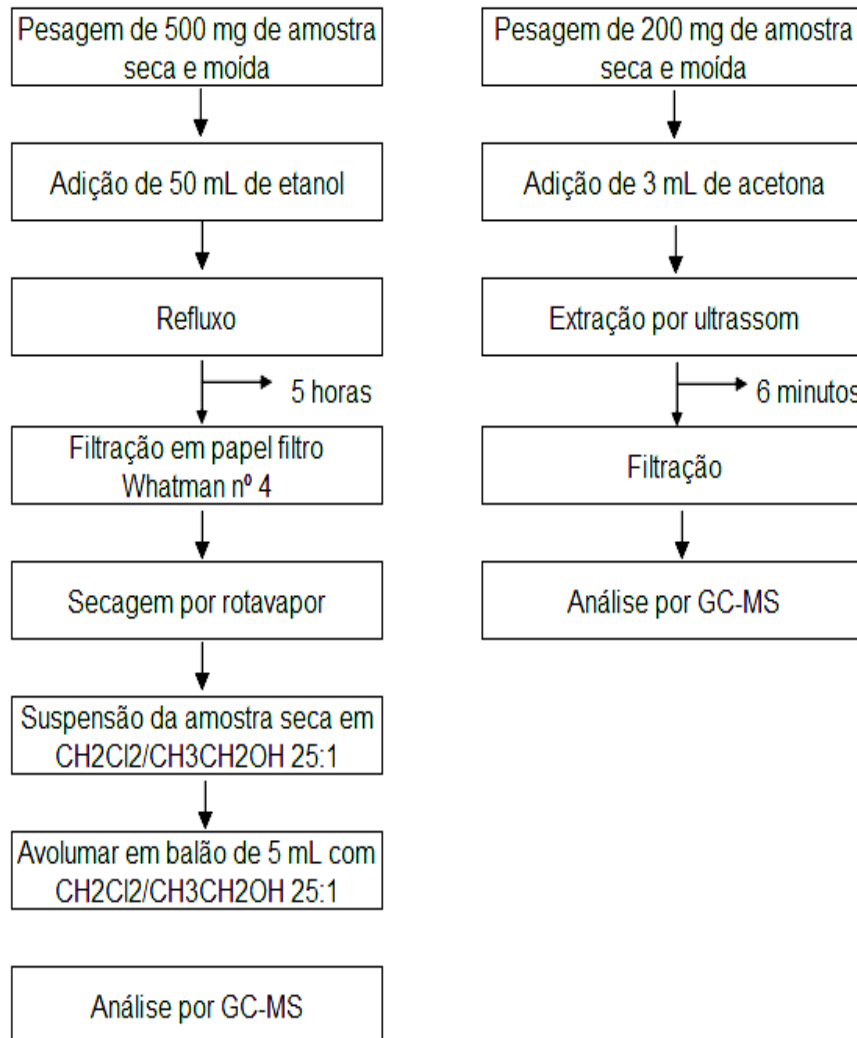
Tempo (minutos)	Técnica de extração	Massa de amostra (mg)	Volume de solvente (mL)	Áreas		Eficiência de extração(%)	
				Capsaicina	Dihidro capsaicina	Capsaicina	Dihidro capsaicina
3	Ultrassom	100	3	367605347	212052892	87	88
				364832781	209731488	87	79

Como se pode verificar, nesse teste não se obteve eficiências de extração próximas a 100% quando comparadas ao método de extração por Soxhlet.

Assim, a metodologia assistida por ultrassom que apresentou melhor eficiência de extração em relação à metodologia oficial de extração de capsaicinóides foi a que tem os seguintes parâmetros de massa de amostra, volume de solvente e tempo de extração mínimo, de respectivamente, 200 miligramas, 3mililitros de acetona e 6 minutos.

A figura 19 permite comparar as etapas do procedimento de extração por Soxhlet com as etapas do procedimento definido pelo método de extração assistida por ultrassom e identificar uma redução significativa de massa de amostra necessária, volume de solvente utilizado para a extração e tempo de duração do ensaio.

Figura 19 - Fluxograma do procedimento de extração por Soxhlet à esquerda e fluxograma do procedimento definido por extração assistida por ultrassom à direita.



7.3 Verificação da relação entre áreas de capsaicina e dihidrocapsaicina e pungência características das pimentas do gênero *Capsicum*.

Após definida a metodologia de extração assistida por ultrassom, foram extraídas por este método as seis pimentas encontradas no mercado local:

- Pimenta A - Pimenta Malagueta- Pertencente ao gênero *Capsicum Frutescens* L.;
- Pimenta B – Pimenta Cumari- do-Pará - Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* L.var. *baccatum*;
- Pimenta C – Pimenta de Bico ou biquinho- Pertencente ao gênero *Capsicum* Chinese;
- Pimenta D- Pimenta Dedo de Moça – Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* var. *pendulum*;
- Pimenta E- Pimenta Calabresa- Pertencente ao gênero *Capsicum baccatum* var. *pendulum*;
- Pimenta F- Pimenta Murupi- Pertencente ao gênero *Capsicum* Chinese.

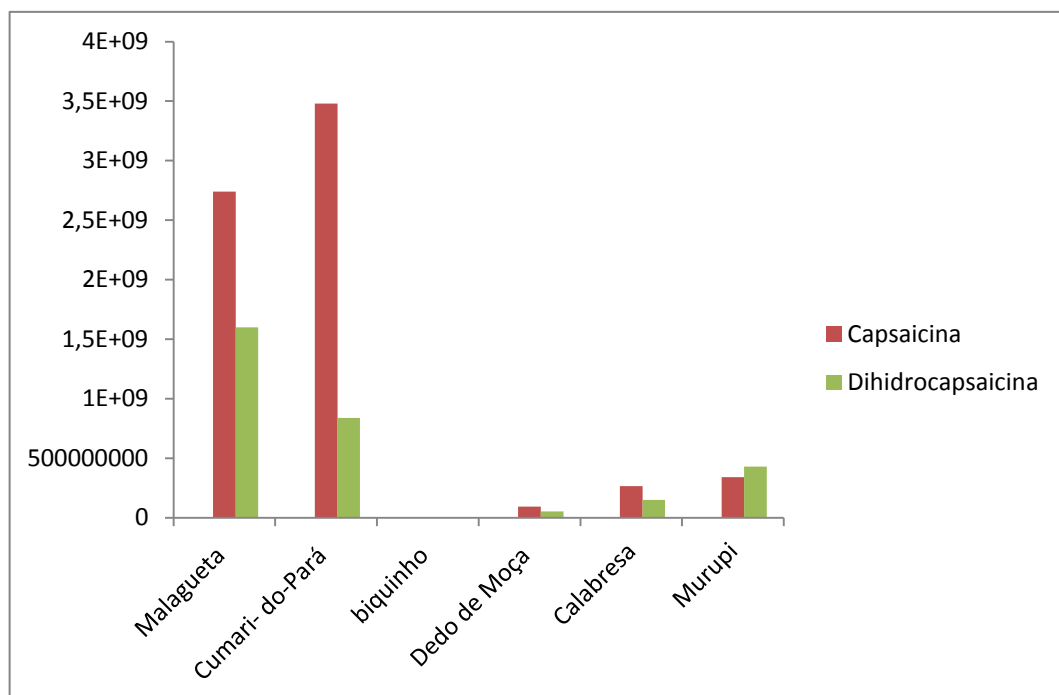
As pimentas Malagueta, Cumari-do-Para e Murupi necessitaram de diluição, pois quando injetadas como foram extraídas ultrapassaram a escala de abundância. Foi retirada uma alíquota de 75 microlitros e avolumadas a 1075 microlitros com acetona as pimentas Malagueta e cumari-do-Pará, ou seja, uma diluição de cerca de 14 vezes. Para a pimenta Murupi não ultrapassar a escala de abundância foi retirado uma alíquota de 500 microlitros do extrato e avolumadas a 1500 microlitros, isto é uma diluição de 3 vezes. As áreas resultantes dos cromatogramas podem ser visualizadas na tabela 5 e a plotagem dessas áreas em um gráfico de barras para melhor visualização das áreas das diferentes pimentas na figura 20.

Tabela 5 - Áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina de todas as pimentas extraídas pela técnica de extração assistida por ultrassom e a soma das áreas desses compostos.

Pimentas	Réplica	Áreas		Soma áreas capsaicina e dihidrocapsaicina
		Capsaicina	Dihidrocapsaicina	
A	1	2740271345*	1599946119*	4196917465
	2	2566703605*	1452583936*	4019287543
B	1	3480783295*	837009367*	4317792663
	2	3364773060*	817433813*	4182206875
C	1	472778	340387	813165
	2	522850	302336	825186
D	1	93187517	53419212	146606729
	2	97025658	49499681	146525339
E	1	264194385	148963701	413158086
	2	271790527	149955755	421746282
F	1	339655230*	429897882*	769553112
	2	335225439*	422528088*	757753527

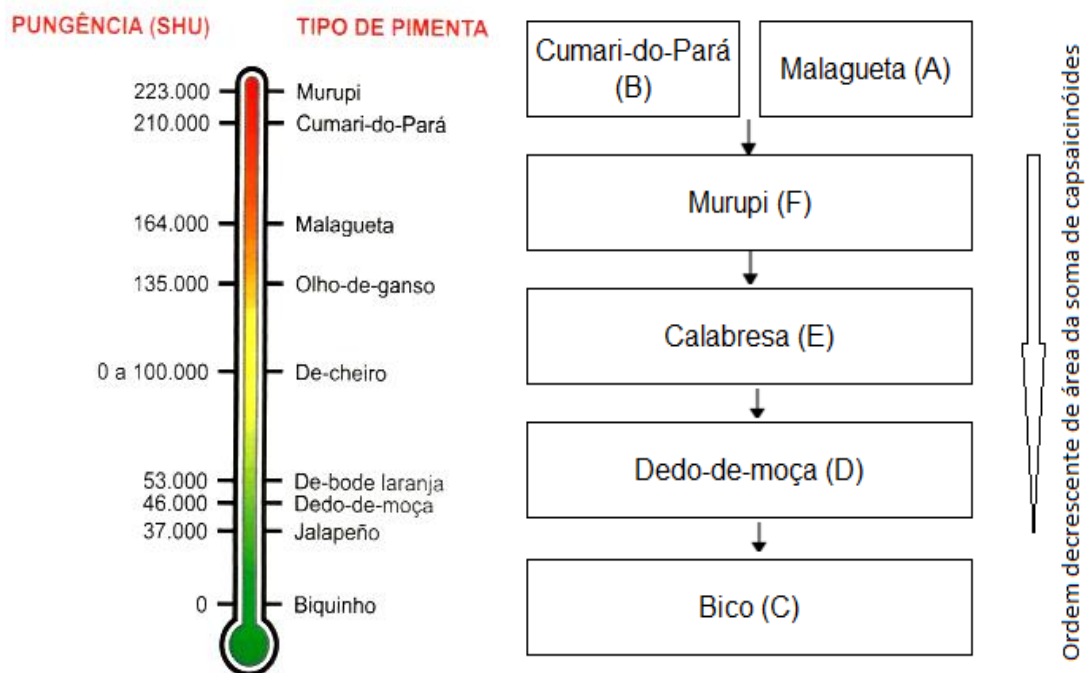
*Áreas corrigidas conforme diluições citadas anteriormente.

Figura 20 - Gráfico contendo as áreas dos compostos capsaicina e dihidrocapsaicina em relação a diversas pimentas analisadas.



Na figura 21 pode-se observar a comparação entre o “Termômetro” do ardume de pimentas brasileiras em escala SHU e o fluxograma segundo a soma das áreas dos capsaicinóides em ordem decrescente pelo método de extração por ultrassom.

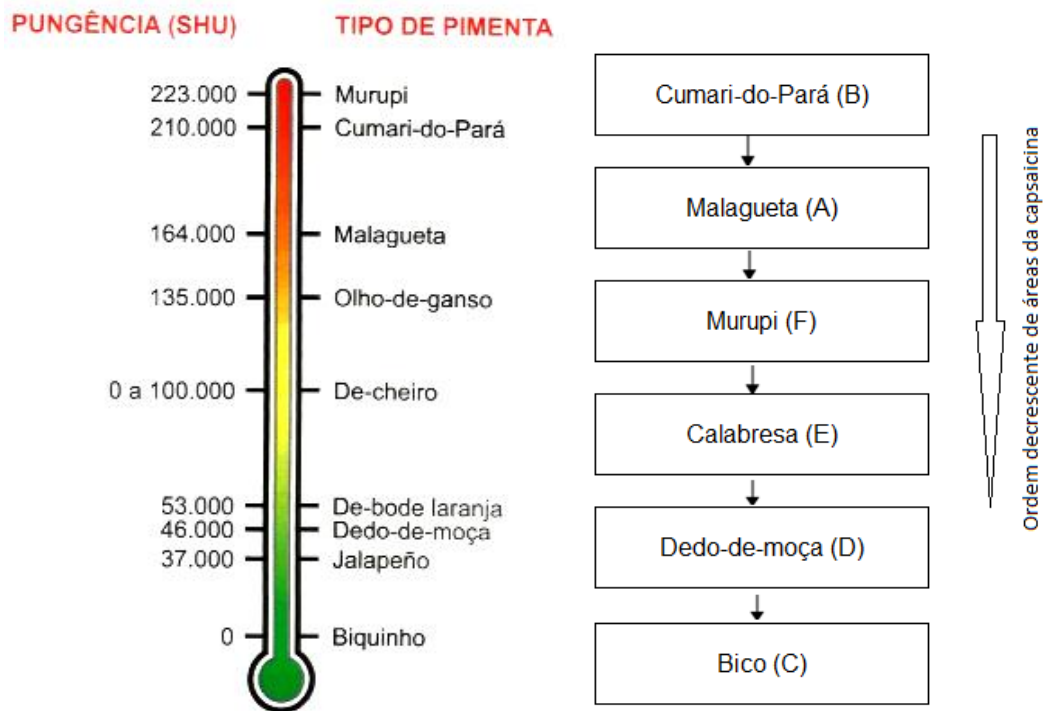
Figura 21 - Comparação entre a escala organoléptica SHU e as respostas das somas das áreas dos capsaicinóides.



Nota-se na figura 21 à esquerda que a escala SHU não contempla uma pimenta extraída pela metodologia de ultrassom, a pimenta calabresa, porém essa pimenta é a pimenta dedo-de-moça desidratada e moída. Pode-se observar que pimentas analisadas por ultrassom tem uma relação diretamente proporcional com a escala organoléptica SHU, excetuando-se a pimenta Murupi.

Contudo, segundo Ribeiro et al. (2008, p. 26), a capsaicina é o composto mais picante entre os capsaicinóides. Assim, classificando somente o composto capsaicina de acordo com as respectivas áreas de cada pimenta a relação diretamente proporcional fica mais evidente quando comparada com a escala organoléptica SHU, excetuando-se ainda a pimenta Murupi, como se pode verificar na figura 22.

Figura 22 - Comparação entre a escala organoléptica SHU e as respostas das áreas da capsaicina.



Apesar da relação diretamente proporcional, excetuando-se a pimenta Murupi, deve-se ter cautela com os valores SHU, pois podem variar em função de linhagem varietal, clima e solo. Além disso, os testes organolépticos SHU são pouco precisos apresentando uma variação de 50% na mesma amostra dependendo do avaliador e também pelo motivo das técnicas analíticas instrumentais não gerarem resultados em unidades Scoville segundo Ribeiro et al. (2008, p. 26). Esses motivos podem ser a explicação da pimenta Murupi não apresentar uma relação direta entre a resposta em área e pungência do método organoléptico SHU.

Nas figuras 23, 24, 25, 26, 27 e 28 encontram-se os cromatogramas das seis pimentas extraídas pelo método de ultrassom em duplicata.

Figura 23 - Cromatograma da pimenta Malagueta pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

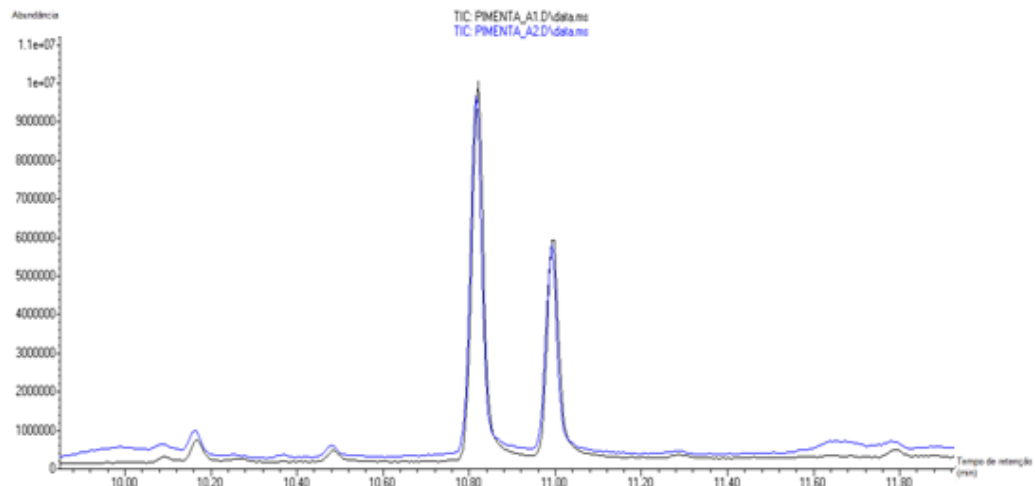


Figura 24 - Cromatograma da pimenta Cumari-do-Pará pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

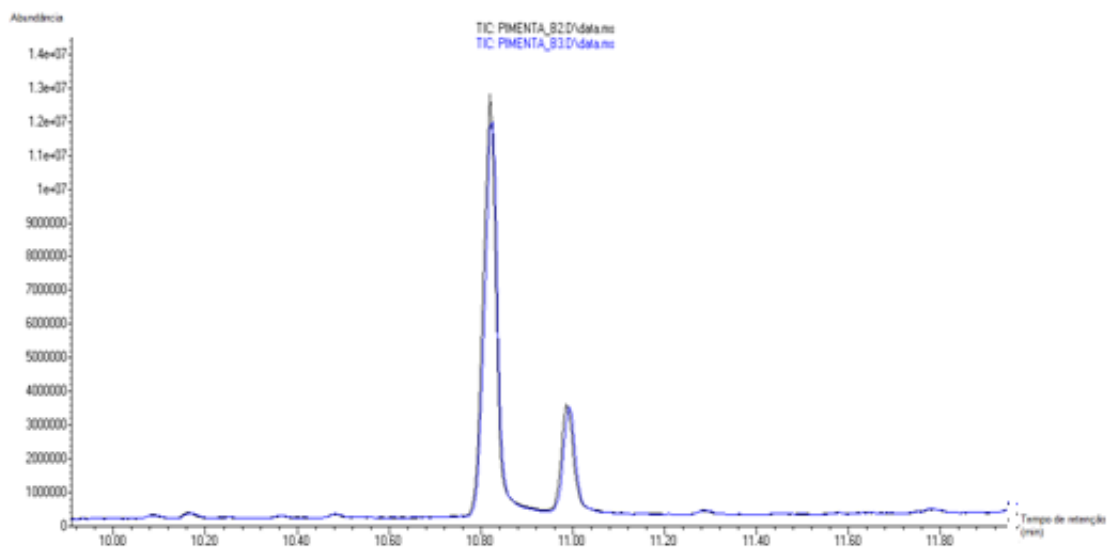


Figura 25 - Cromatograma da pimenta de Bico ou biquinho pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

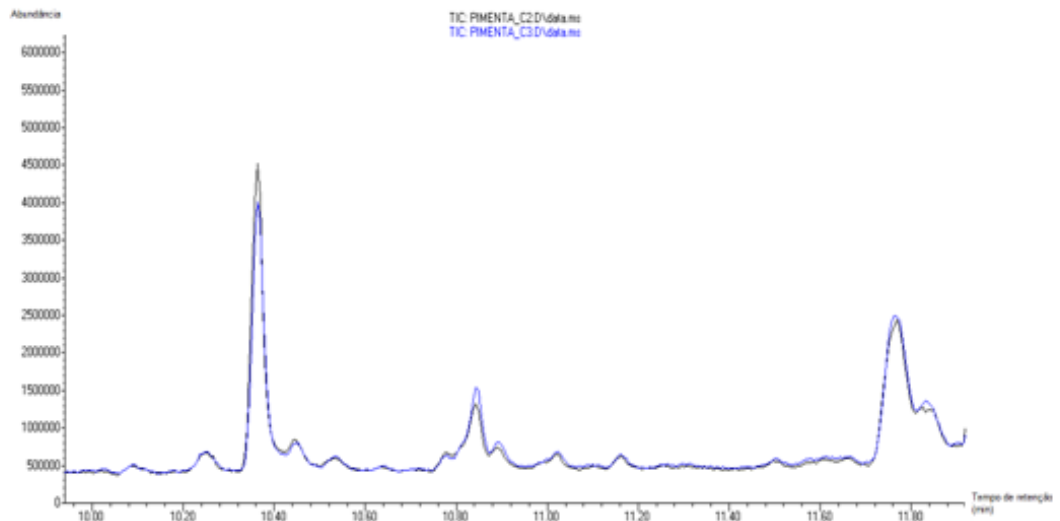


Figura 26 - Cromatograma da pimenta Dedo-de-Moça pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

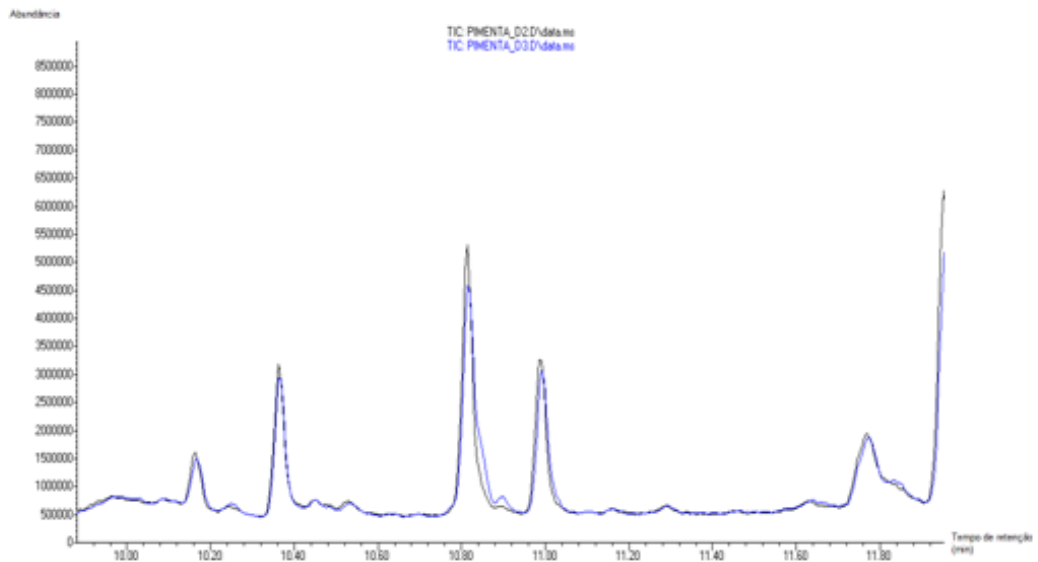


Figura 27 - Cromatograma da pimenta Calabresa pela metodologia de extração assistida por ultrassom.

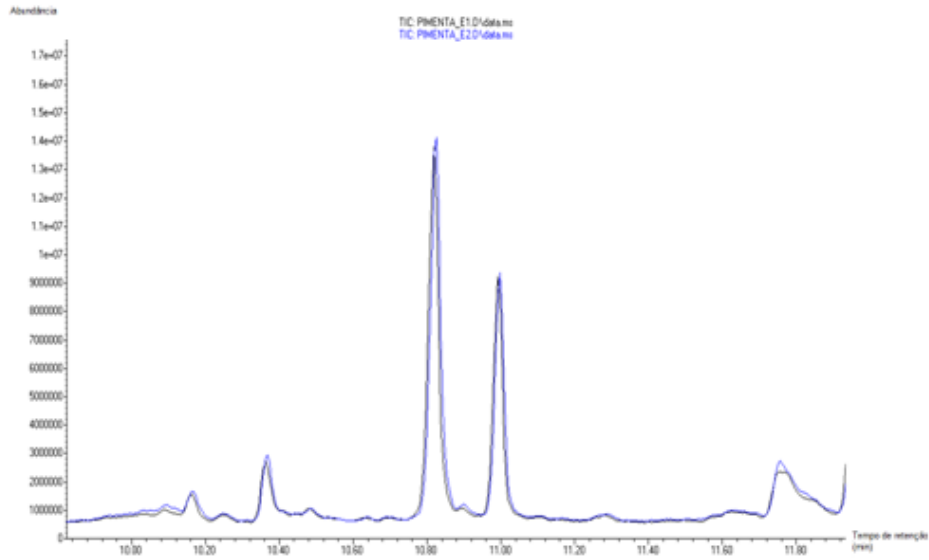
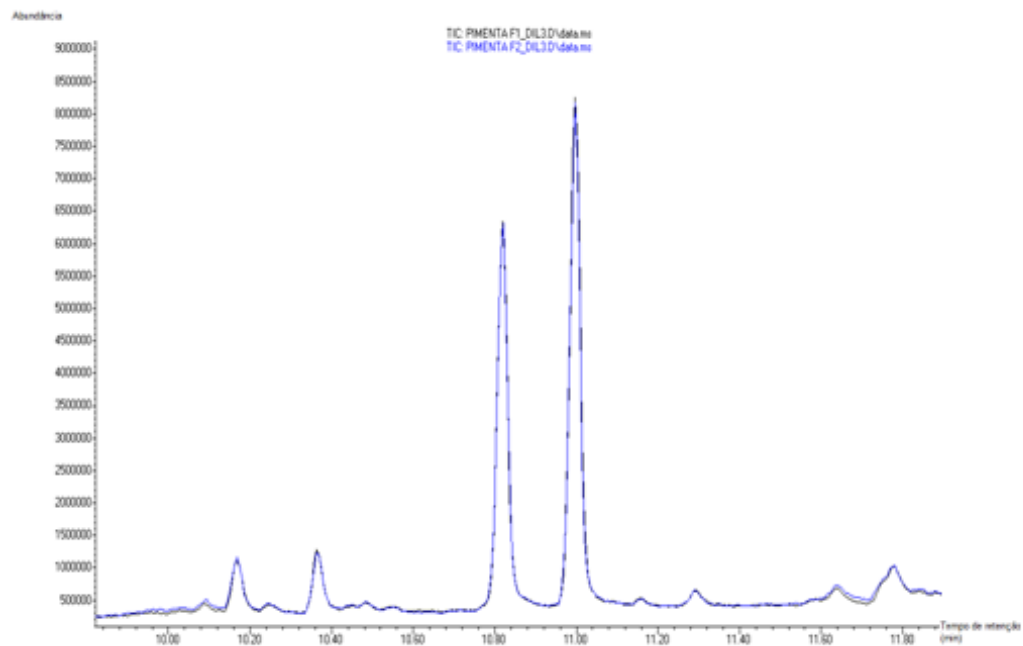


Figura 28 - Cromatograma da pimenta Murupi pela metodologia de extração assistida por ultrassom.



Os cromatogramas das pimentas Malagueta, Cumari-do-Pará, Biquinho, Dedo-de-moça e Calabresa apresentam o mesmo perfil característico do analito capsaicina ser mais abundante que o analito dihidrocapsaicina com exceção da pimenta Murupi apresentar o analito dihidrocapsaicina mais abundante que o analito capsaicina.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que é possível analisar os compostos capsaicina e dihidrocapsaicina através da metodologia de extração assistida por ultrassom apresentando resultados satisfatórios quando comparados à metodologia oficial de extração por Soxhlet. A metodologia de extração assistida por ultrassom diminuiu consideravelmente a massa de amostra necessária, bem como o volume de solvente, a quantidade de vidrarias e principalmente o tempo dispensado para a execução da extração. Foi possível confirmar a relação diretamente proporcional entre áreas da capsaicina e a escala organoléptica de pungência SHU das pimentas brasileiras. Porém é necessário ter cautela quando se relaciona resultados analíticos e dados de testes organolépticos porque testes como o Scoville Heat Unit (SHU) são pouco precisos, apresentam muita subjetividade e oferecem grande variação quando há a mudança de avaliador, motivos que podem ser associados à pimenta Murupi não apresentar uma relação direta com a ardência característica dessa pimenta.

Além disso, otimizações em processos de análises são de extrema importância para laboratórios de grandes empresas e esse trabalho apresentou-se satisfatório na possibilidade de otimizações de metodologias de extração já existentes na literatura para os capsaicinóides, alcalóides largamente utilizados atualmente em diversas áreas.

REFERÊNCIAS

- BAJAJ, K. L.; KAUR, G. Colorimetric Determination of Capsaicin in Capsicum Fruits with the folin- ciocalteu reagent. **Mikrochimica acta**, India, p. 81-86, 1979.
- BARBERO, G. F.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high- performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, Spain, n. 578, p. 227-233, 2006.
- BEAUDRY, F.; VACHON, P. Quantitative determination of capsaicin, a transient receptor potential channel vanilloid 1 agonist, by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry: evaluation of in vitro metabolic stability. **Biomedical Chromatography**, n. 23, p. 204-211, 2009.
- BINSHTOK, A. M.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. Inhibition of nociceptores by TRPV-1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. **Nature**, USA, n. 10, p. 449-607, 2007.
- BRUM, A. A. S; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Past and Present panacea. **Journal of Chromatography A**, Córdoba, n. 1217, p. 2383-2389, 2010.
- CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; COTTER, J. L. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum Chinese*. **Food and Bioproducts Processing**, USA, v. 89, n. 4, p. 340-345, 2011.
- CHOI et al. Analysis of the Contents of Pungent Compounds in Fresh Korean Red Peppers and in Pepper- Containing Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Korea, n. 54, p. 9024-9031, 2006.
- CISNEROS-PINEDA, O.; TORRES-TAPIA, L. W.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L. C. Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan. **Food Chemistry**, México, n. 104, p. 1755-1760, 2007.
- CONTRERAS-PADILLA, M.; YAHIA, E. M. Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, México, n. 46, p. 2075-2079, 1998.
- DAOOD, H. G. et al. Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane. **Journal of subcritical Fluids**, Hungary, n. 23, p. 143-152, 2002.
- IWAI, K. et al. Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, Japan, n. 172, p. 303-311, 1979.

KAALE, E. et al. Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Belgium, v.30, n. 4, p. 1331-1337, 2002.

KASBIA, S.G. Functional Foods and nutraceuticals in the management of obesity. **Nutrition & Food Science**, Canada, n. 35, p. 344-352, 2005.

KULKA, K. Aspects of functional groups and flavor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 15, p. 48-57, 1967.

LINGUANOTTO NETO, N. **Dicionário Gastronômico**: pimentas com suas receitas. São Paulo: Boccato, 2004.

MARKOVITS, E.; GILHAR, A. Capsaicin: an effective topical treatment in pain. **Internacional Journal of Dermatology**, Israel, n. 36, p. 401-404, 1997.

McNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**. 2.ed. Canadá: A Jhon Wiley & Sons, 2009.

NIESSEN, W. M. A. **Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 2001.

PEÑA- ALVAREZ, A.; ALVARADO, L. A.; VERA-AVILA, L. E. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by Gas Chromatography-mass spectrometry. **Instrumentation Science and Technology**, México, n. 40, p. 429-440, 2012.

PEÑA- ALVAREZ, A.; RAMÍREZ- MAYA, E.; ALVARADO-SUÁREZ, L. A. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, México, n. 1216, p. 2843-2847, 2009.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, M. D. L. Analytical uses of ultrasound. **Trends in Analytical Chemistry**, Córdoba, v. 23, n. 9, 2004.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Capsicum**: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

REILLY, C. A. et al. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self- defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A, USA**, n. 912, p. 259-267, 2001.

REYES-ESCOGIDO, M. L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E. G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. **Molecules**, n. 16, p. 1253-1270, 2011.

RIBEIRO, C. S. C. et al. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008.

SURH, Y. More than Spice: *capsaicin* in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 94, p. 1263-1265, 2002.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (*Capsicum*) receptor and mechanisms. **Pharmacological Reviews**, n. 31, p. 139-212, 1999.

ZANGH, Q.; HU J.; SHENG LI.; LI, Y. Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, China, n. 8, p. 2292-2297, 2010.

ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P. W. Capsaicinoids profile are not good chemotaxonomic indicators for capsaicin spices. **Biochemical Systematics and Ecology**, USA, n. 29, p. 161-169, 2001.

ANEXO A - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS NO MODO SCAN DE AQUISIÇÃO DE DADOS PARA OS CAPSAICINÓIDES

(CAPSAICIN.M)

- Coluna: DB -5 - Comprimento: 30m; Diâmetro Interno: 320 um; Espessura de Filme: 0,25 um- Fase estacionária: 5% Difenil – dimetilpolisiloxano - Marca: Agilent; Temperatura Máxima: 300 °C.

Injetor:

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Pressão: 7 psi - Modo: Pressão Constante;
- Modo de injeção: Splitless;
- Gás de arraste: Hélio;
- Volume de injeção: 1 uL.

Forno:

- Programa de Temperatura: 150 °C(1 min); 200°C (0 min) -20°C /min; 280 °C (9min) - 10°C /min.

Informações do MS:

- Solvente Delay: 2.00 min;
- Temperatura do quádruplo:150°C;
- Temperatura da fonte de íons: 230°C;
- Temperatura da interface: 280°C.

Parâmetros do SCAN:

- Low mass: 50 u.m.a.
- High mass: 550 u.m.a.
- Threshold: 150 u.m.a.