

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Pimenta-do-reino do Espírito Santo: avaliação do teor de piperina, composição do óleo essencial e composição elementar

Black pepper of Espírito Santo: evaluation of piperine content, essential oil composition and elemental composition

Luiza Valli Vieira

Tese de doutorado em Química

**Vitória
2021**

Luiza Valli Vieira

Pimenta-do-reino do Espírito Santo: avaliação do teor de piperina, composição do óleo essencial e composição elementar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título Doutor em Química.

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Elementos traço e Química Ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster

**VITÓRIA
2021**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V657p Vieira, Luiza Valli, 1989-
Pimenta-do-reino do Espírito Santo: avaliação do teor de piperina, composição do óleo essencial e composição elementar / Luiza Valli Vieira. - 2021.
127 f. : il.

Orientadora: Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima.
Coorientador: Ricardo Machado Kuster.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Pimenta-do-reino. 2. Efeitos da secagem. 3. Variação Sazonal. 4. Piperina. 5. Composição do óleo essencial. 6. Composição elementar. I. Lima, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro. II. Kuster, Ricardo Machado. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. IV. Título.

CDU: 54

Pimenta-do-reino do Espírito Santo: avaliação do teor de piperina,
composição do óleo essencial e composição elementar

Luiza Valli Vieira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em 24/09/2021 por:

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima¹
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador(a)



Documento assinado digitalmente
KEYLLER BASTOS BORGES
Data: 09/11/2021 09:45:15-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Juliano Souza Ribeiro¹
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges¹
Universidade Federal de São João del-Rei

Prof.^a Dr.^a Geisamanda Pedrini Brandão Athayde¹
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Warley de Souza Borges¹
Universidade Federal do Espírito Santo

¹ O documento será assinado eletronicamente em conformidade com as normas prescritas na Portaria Normativa PRPPG/ UFES nº 03/2020.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARIA TEREZA WEITZEL DIAS CARNEIRO LIMA - SIAPE 1116651
Departamento de Química - DQ/CCE
Em 04/11/2021 às 14:39

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/301185?tipoArquivo=O>

Emitido em 04/11/2021

ANEXO Nº 19/2021 - VVL-CCTQ (11.02.34.01.08.02.06)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 04/11/2021 21:12)

JULIANO SOUZA RIBEIRO

PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO

VVL-CCTQ (11.02.34.01.08.02.06)

Matrícula: 1813880

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: **19**, ano: **2021**, tipo: **ANEXO**, data de emissão: **04/11/2021** e o código de verificação: **6a011c1904**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
GEISAMANDA PEDRINI BRANDAO ATHAYDE - SIAPE 1775795
Departamento de Química - DQ/CCE
Em 10/11/2021 às 15:34

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/305633?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
WARLEY DE SOUZA BORGES - SIAPE 1817281
Departamento de Química - DQ/CCE
Em 11/11/2021 às 19:10

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/307026?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora (e mais recentemente chefe) Maria Tereza W. D. Carneiro por esses 10 anos de ensinamentos, apoio e por toda a confiança em mim depositada. Você me fez evoluir muito, pessoalmente e profissionalmente. Ao longo desses anos acredito que construímos uma relação de respeito e confiança. Hoje me despeço de você como aluna, mas espero continuar como parceira de trabalho.

Agradeço ao Otávio Arruda Heringer, pelo seu amor, amizade e paciência. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos ao longo desses anos, por ser meu parceiro e me ajudar em todas as fases deste trabalho. Muito obrigada por sempre acreditar na minha capacidade, me fazendo acreditar que eu seria capaz de terminar mais essa etapa, além de sempre me incentivar a melhorar.

Aos meus amigos de graduação e pós-graduação que levo para a vida. Júlia Leite, minha amiga desde o primeiro dia de aula na graduação, Maria Aparecida, Murilo Souza, Maiara Krause, Tiago Cunha, Luma Magnago e Jefferson Souza. A vida na UFES foi bem mais fácil com vocês ao meu lado.

Ao meu co-orientador, Ricardo M. Kuster, que sempre estava disponível quando eu o procurava para tirar dúvidas. Sempre vou me lembrar de sua empolgação quando conversávamos sobre o projeto.

À Maria Eduarda M. Juvenato, aluna de IC, que desenvolveu junto comigo esse trabalho. Adorei trabalhar com você.

Mariana Vinha e Inobert Lima, ambos do INCAPER, pela ajuda com a seleção dos produtores e na etapa de coleta das amostras.

Agradeço novamente ao Otávio, agora como gerente técnico do laboratório Tommasi Ambiental pela disponibilização de recursos e infraestrutura para realização de várias atividades deste projeto, além de todo o ensinamento com a parte cromatográfica.

Ao professor Warley de Souza Borges, por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório Química de produtos naturais para a realização de algumas atividades deste projeto.

Ao professor Juliano Souza Ribeiro, por toda sua contribuição com a parte quimiométria desse trabalho e pelas importantes considerações na banca de qualificação.

Agradeço à professora Geisamanda Pedrini Brandão Athayde pelas importantes considerações na qualificação e por todos esses anos de ensinamento que eu estive no LEA.

Agradeço novamente ao Warley, Juliano e Geisamanda, e ao professor Keyller Bastos Borges por terem aceitado fazer parte da banca de defesa.

Agradeço a todos que passaram pelo Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA) ao logo desses quase 10 anos de existência, aprendi um pouquinho com cada um de vocês.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo e ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo pela infraestrutura. A CAPES e FAPES pelo apoio financeiro.

Por fim agradeço aos meus pais, Luiz Augusto e Maria Olívia, meus irmãos Diana, André e Fábio e em especial ao meu sobrinho Lucca. Meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

“Capricho é você fazer o teu melhor na condição que você tem enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda.”
Mario Sergio Cortella

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Espiga de pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal..... | 26 |
| Figura 2. Pimenteira-do-reino. Fonte: Acervo pessoal | 27 |
| Figura 3. Resumo do processo de produção de pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de: < http://www.fao.org/3/a-au148e.pdf >. Acesso em nov. 2019..... | 30 |
| Figura 4. Secagem Natural em Terreiro da pimenta-do-reino: (A) em lona; (B) – área cimentada. Fonte: (A) < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108271/1/Folder-Colheita- Pimenta.pdf >. Acesso em nov. 2019. (B) Acervo Pessoal..... | 32 |
| Figura 5. Secagem natural em estufa da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal. | 32 |
| Figura 6. Secagem natural em estufa com estrutura de jirau adaptada. Fonte: Captura de tela do vídeo disponível em < https://www.youtube.com/watch?v=e1wsDe_bldk >. Acesso em nov. 2019. | 33 |
| Figura 7. Secador para método de fogo direto da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal. | 33 |
| Figura 8. Secador para método de fogo indireto da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal. | 34 |
| Figura 9. Histórico da produção de pimenta-do-reino no Brasil no período de 2008 a 2019. Fonte: IBGE, 2021..... | 35 |
| Figura 10. Estrutura química da piperina | 36 |
| Figura 11. Esquema simplificado da biossíntese de terpenos nas plantas. Fonte: (Taiz & Zeiger, 2002)..... | 42 |
| Figura 12. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial da pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de (Adams, 2017)..... | 45 |
| Figura 13. Localização dos produtores de pimenta-do-reino. | 56 |
| Figura 14. Cromatogramas obtidos em 343 nm pelo método desenvolvido [A] da pimenta-do-reino e [B] da pimenta-do-reino com adição de 10 µg mL ⁻¹ de padrão de piperina. | 63 |
| Figura 15. Espectro UV da piperina obtido [A] da amostra de pimenta-do-reino e [B] do padrão de piperina. | 63 |
| Figura 16. Curva analítica [A] para a determinação da piperina em pimenta-do-reino e gráfico de resíduos [B] em função da concentração da faixa linear de trabalho. | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Diagrama de Ishikawa das fontes de incerteza associadas baseado no modelo matemático do mensurando. | 68 |
| Figura 18. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina por campanha de coleta. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 70 |
| Figura 19. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina por campanha de coleta de cada produtor. | 71 |
| Figura 20. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina nas amostras de pimenta-do-reino classificada por tipo de secagem. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 72 |
| Figura 21. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina nas amostras de pimenta-do-reino por tipo de secagem em cada campanha de coleta. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 73 |
| Figura 22. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina nas amostras de diferentes localidades. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 74 |
| Figura 23. Média das áreas relativas das classes terpênicas: Monoterpenos (M) e Sesquiterpenos (S) em relação as campanhas de coleta. Letras iguais em barras de mesma classe terpênica não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 82 |
| Figura 24. Média das áreas relativas das classes terpênicas: Monoterpenos (M) e Sesquiterpenos (S) em relação os tipos de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Letras iguais em barras de mesma classe terpênica não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$ | 82 |
| Figura 25. Análise de componentes principais: Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da composição do óleo essencial em relação ao tipo de secagem das amostras de pimenta-do-reino. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. | 83 |
| Figura 26. Análise de componentes principais: (A) Gráficos <i>biplot</i> de <i>scores</i> e <i>loadings</i> com 3 componentes principais da composição do óleo essencial em relação as campanhas de coleta (B) PC1 x PC2 (C) PC1 x PC3 | 84 |
| Figura 27. Análise de componentes principais: Gráfico <i>biplot</i> de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para avaliação do óleo essencial em relação a localidade. | 87 |

| | |
|--|-----|
| Figura 28. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por campanha de coleta. Para a,b,c $p < 0,05$ | 100 |
| Figura 29. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por campanha de coleta. Para a,b,c $p < 0,05$ | 101 |
| Figura 30. Análise de componentes principais: Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da composição elementar em relação as campanhas de coleta das amostras de pimenta-do-reino. | 102 |
| Figura 31. Secadores dos produtores das amostras de pimenta-do-reino coletadas (A): Secagem mecânica com fogo indireto (MFI); (B): Secagem mecânica com fogo direto (MFD). Fonte: Acervo Pessoal. | 103 |
| Figura 32. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por tipo de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Para a,b,c $p < 0,05$ | 104 |
| Figura 33. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por tipo de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Para a,b,c $p < 0,05$ | 105 |
| Figura 34. Análise de componentes principais: Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> da composição elementar em relação aos tipos de secagem das amostras de pimenta-do-reino. | 106 |
| Figura 35. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por localização geográfica. Para a,b $p < 0,05$ | 109 |
| Figura 36. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por localização geográfica. Para a,b $p < 0,0$ | 110 |
| Figura 37. Análise de componentes principais: Gráfico de <i>scores</i> para avaliação da composição elementar em relação a localidade. | 111 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Composição Nutricional Média de 100 g de pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de: < https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170931/nutrients >. Acesso em nov. 2019. | 28 |
| Tabela 2. Limites Máximo de Contaminantes Inorgânicos (arsênio, cádmio e chumbo) em Legumes (sementes secas das leguminosas) exceto soja. Fonte: (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013)..... | 49 |
| Tabela 3. Comparação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino de diferentes países (concentração média \pm desvio padrão). | 53 |
| Tabela 4. Coordenadas Geográficas, tipo de secagem de cada produtor de pimenta-do-reino e código das amostras. | 56 |
| Tabela 5. Gradiente da fase móvel do método desenvolvido para determinação de piperina em pimenta-do-reino..... | 58 |
| Tabela 6. Níveis de concentração utilizados para a elaboração da curva analítica...61 | |
| Tabela 7. Concentração de piperina no extrato de pimenta-do-reino em 260 nm e 343 nm. | 64 |
| Tabela 8. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do método desenvolvido, o LQ na amostra em mg g^{-1} e o limite de quantificação praticado (LQP) na amostra em mg g^{-1} | 64 |
| Tabela 9. Tabela de análise da variância para ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados. | 65 |
| Tabela 10. Resultados de recuperação da piperina em porcentagem do método desenvolvido. | 66 |
| Tabela 11. Resultados da repetibilidade do método desenvolvido na faixa baixa, média e alta. | 66 |
| Tabela 12. Resultados da precisão intermediária do método desenvolvido na faixa baixa, média e alta. | 67 |
| Tabela 13. Identificação dos compostos dos óleos essenciais de pimenta-do-reino do ES analisados por GC-MS. | 79 |
| Tabela 14. Identificação dos compostos majoritários (>1%) dos óleos essenciais de pimenta-do-reino do ES e de diferentes localidades. | 86 |
| Tabela 15. Condições Operacionais do ICP OES. | 89 |

| | |
|--|----|
| Tabela 16. Condições Operacionais do ICP-MS NexION™ 300. | 90 |
| Tabela 17. Programa de aquecimento utilizado na decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. | 91 |
| Tabela 18. Comprimento de onda, faixa de trabalho e coeficientes angulares e de determinação dos elementos determinados por ICP OES. | 92 |
| Tabela 19. Limites de detecção (LD) do método e limites de quantificação (LQ) na amostra dos analitos determinados por ICP OES. | 93 |
| Tabela 20. Comparação entre os valores encontrados e os certificados para o MRC de folha de tomate - Agro C1003a (n = 3) dos analitos determinados por ICP OES. | 94 |
| Tabela 21. Teste de adição e recuperação para avaliação da exatidão dos analitos determinados por ICP OES. | 95 |
| Tabela 22. Faixa de trabalho, coeficientes angulares e de determinação dos elementos determinados por ICP-MS. | 96 |
| Tabela 23. Limites de detecção (LD) do método e limites de quantificação (LQ) na amostra dos analitos determinados por ICP-MS. | 96 |
| Tabela 24. Comparação entre os valores encontrados e os certificados para o MRC de folha de tomate - Agro C1003a (n = 3) dos analitos determinados por ICP-MS. | 97 |
| Tabela 25. Teste de adição e recuperação para avaliação da exatidão dos analitos determinados por ICP-MS. | 97 |
| Tabela 26. Concentração média e mediana das amostras cultivadas no Espírito Santo. | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação Oficial de Química Analítica

C1 – Campanha 1

C2 – Campanha 2

C3 – Campanha 3

C4 – Campanha 4

CV – Coeficiente de variação

DMAPP – Difosfato de dimetilalila

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

EAU – Extração assistida por ultrassom

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Chama, do inglês, flame atomic absorption spectrometry

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês, gas chromatography coupled with mass spectrometry

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês, atomic absorption spectrometry graphite furnace

HCA – Análise de agrupamentos hierárquicos, do inglês, Hierarchical cluster analysis

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, High Efficiency Liquid Chromatography

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, do inglês, High Efficiency Liquid Chromatography with Diode Array Detector

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP – Plasma indutivamente acoplado, do inglês, Inductively coupled plasma

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IK – Índices de Kovats

IPP – Difosfato de isopentenila

ISO – Organização padrão internacional, do inglês, International Standard Organization

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MEP – Rota do metileritriol-4-fosfato

MFD – Mecânica fogo direto

MFI – Mecânica fogo indireto

MRC – Material de Referência Certificado

NE – Natural Estufa

NT – Natural Terreiro

OE – Óleo essencial

PCA – Análise de Componentes Principais, do inglês, Principal Component Analysis

PCs – Componentes principais, do inglês, Principals components

PZ – Alcanos

R^2 – Coeficiente de determinação

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês, Relative standard deviation

RT – Tempo de retenção

s – Desvio padrão

t – Abscissa da distribuição de Student

UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl – Ácido clorídrico
HNO₃ – Ácido nítrico
H₂O – Água
bar – Bar
cm – Centímetro
a – Coeficiente angular
eV – Elétron-volt
g – Grama
°C – Grau Celsius
h – Hora
K – Kelvin
KHz – Kilohertz
KJ – Kilojoule
L – Litro
log – Logaritmo
m – Massa
MΩ – Mega ohm
m – Metro
m² – Metro quadrado
μg – Micrograma
μL – Microlitro
μm – Micrometro
mAU – Mili absorbância unidade
mA – Miliampere
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mm – Milímetro
min – Minuto
ng – Nanograma
nm – Nanômetro
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

% – Porcentagem

kca – Quilocaloria

kg – Quilograma

m/z – Razão massa–carga

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

T – Temperatura

t – Tempo

T – Tesla

torr – Torr

v – Volume

W – Watts

RESUMO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma das especiarias mais consumidas e comercializadas no mundo, sendo cultivada em várias regiões tropicais, principalmente no Vietnã, Indonésia, Brasil e Índia. A avaliação da qualidade da pimenta-do-reino está relacionada principalmente ao seu sabor e odor, bem como pela presença de contaminantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da pimenta-do-reino em relação ao teor de piperina, composição do óleo essencial e composição elementar nas amostras de pimenta-do-reino cultivadas no Espírito Santo (ES), Brasil. A influência do tipo de secagem e o período da colheita também foi estudada. Amostras de outras localidades: Equador, Vietnã, Malásia, Indonésia, Índia e Sri Lanka foram utilizadas para comparação. Para a determinação do teor de piperina, foi realizada uma extração sólido-líquido com etanol assistido por ultrassom e o extrato foi analisado por HPLC-DAD, após a validação da metodologia. A avaliação da composição volátil da pimenta-do-reino, foi obtido o óleo essencial pelo método de hidrodestilação com auxílio de um aparelho Clevenger. O material destilado foi analisado por GC-MS, onde foi obtido o perfil cromatográfico. Por fim, a avaliação da composição elementar, as amostras foram secas e em seguida foi realizada uma decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas, os analitos foram determinados por ICP OES e ICP-MS. Foi observado que o período da colheita tem pouca interferência no teor de piperina nas pimentas-do-reino. Entretanto, a campanha 2 (Nov/17) apresentou alterações na composição do óleo essencial e redução de macronutrientes Ca, K, Mg e S e do micronutriente B, inferindo que nesta campanha houve modificação no metabolismo secundário do vegetal. As secagens mecânicas (com fogo direto e fogo indireto) provocaram alterações na composição do óleo essencial, que estão relacionadas à exposição à altas temperaturas durante o processamento. Adicionalmente, observou-se incremento de Fe e Cr em secagem mecânica com fogo direto, em consequência de contato direto com estruturas metálicas e com o material particulado proveniente da queima. Além disso, independentemente do tipo de secagem ou campanha de coleta foi encontrado concentrações de As e Pb acima dos limites máximos estabelecidos para algumas amostras, com valores máximos encontrados de 0,46 e 0,56 mg kg⁻¹ excedendo os limites seguros para o consumo humano de acordo com a legislação brasileira. Nesse estudo também foi possível observar que as amostras cultivadas no ES apresentam características marcantes comparadas com as amostras das outras localidades, sendo possível garantir a origem geográfica da pimenta-do-reino utilizando o perfil multielementar e a composição do óleo essencial juntamente com a análise de componentes principais.

Palavras-chave: Pimenta-do-reino; Efeitos da secagem; Variação Sazonal; Piperina; Composição do óleo essencial; Composição elementar.

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.) is one of the most widely consumed and commercialized spices in the world, and it is grown in several tropical regions, mainly Vietnam, Indonesia, Brazil, and India. The evaluation of the quality of black pepper is mainly related to its flavor and odor, as well as the presence of contaminants. The aim of this study was to assess the quality of black pepper in terms of piperine content, essential oil composition, and elemental composition in black pepper samples grown in Espirito Santo (ES), Brazil. The effect of drying type and harvest period was also investigated. For comparison, samples from Ecuador, Vietnam, Malaysia, Indonesia, India, and Sri Lanka were used. To determine the piperine content, an ultrasound-assisted solid-liquid ethanol extraction was performed, and the extract was analyzed by HPLC-DAD, after validation of the methodology. The essential oil of black pepper was extracted using the hydrodistillation method with the aid of a Clevenger apparatus to evaluate its volatile composition. The chromatographic profile was obtained after GC-MS analysis of the distilled material. Finally, the elemental composition was evaluated by drying the samples and then performing an acid decomposition assisted by microwave radiation. The analytes were determined using ICP OES and ICP-MS. It was observed that the harvest period has little influence on the piperine content of black peppers. Campaign 2 (Nov/17), on the other hand, showed changes in the composition of the essential oil as well as a reduction in macronutrients Ca, K, Mg, and S as well as micronutrient B, implying that there was a change in the plant's secondary metabolism during this campaign. Mechanical drying (with direct and indirect fire) caused changes in the composition of the essential oil, which are related to exposure to high temperatures during processing. Furthermore, as a result of direct contact with metallic structures and particulate material from burning, an increase in Fe and Cr was observed in mechanical drying with direct fire. Furthermore, regardless of the type of drying or collection campaign used, As and Pb concentrations were found to be higher than the maximum limits established for some samples, with maximum values of 0.46 and 0.56 mg kg⁻¹ found to be higher than the safe limits for human consumption established by Brazilian legislation. In this study, it was also possible to observe that the samples cultivated in ES have remarkable characteristics when compared to samples from other locations, and it is possible to guarantee the geographic origin of black pepper using the multi-element profile and essential oil composition, as well as the analysis of main components.

Keywords: Black pepper, Drying effects; Seasonal variation; Piperine, Essential oil composition, Elementary composition.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 24 |
| CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 26 |
| 1.1. Aspectos gerais da Pimenta-do-Reino | 26 |
| 1.1.1. Botânica e Composição nutricional | 27 |
| 1.1.2. Cultivo e Processamento da Pimenta-do-reino | 29 |
| 1.1.3. Conjuntura econômica e produtiva da pimenta-do-reino | 35 |
| 1.2. Piperina | 36 |
| 1.2.1. Atividades biológicas da piperina | 37 |
| 1.2.2. Determinação do teor de piperina | 37 |
| 1.3. Óleos essenciais | 39 |
| 1.3.1. Óleos essenciais da pimenta-do-reino | 42 |
| 1.4. Composição elementar na pimenta-do-reino | 47 |
| 1.4.1. Contaminantes inorgânicos na pimenta-do-reino | 49 |
| 1.4.2. Determinação elementar em amostras de pimenta-do-reino | 50 |
| CAPÍTULO 2: ÁREA DE ESTUDO | 55 |
| CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIPERINA EM PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO | 57 |
| 3.1. OBJETIVO | 57 |
| 3.1.1. Objetivo Geral | 57 |
| 3.1.2. Objetivos Específicos | 57 |
| 3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 57 |
| 3.2.1. Padrões e reagentes | 57 |
| 3.2.2. Instrumentação | 58 |
| 3.2.3. Preparo de amostras | 58 |
| 3.2.4. Validação Analítica | 59 |
| 3.2.5. Análise estatística | 62 |
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 62 |
| 3.3.1. Validação Analítica | 62 |
| 3.3.2. Avaliação do teor de piperina em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES .. | 68 |
| 3.3.3. Avaliação do teor de piperina em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades | 73 |
| 3.4. CONCLUSÃO | 74 |
| CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO PERFIL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO | 75 |
| 4.1. OBJETIVO | 75 |
| 4.1.1. Objetivo Geral | 75 |
| 4.1.2. Objetivos Específicos | 75 |
| 4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 75 |
| 4.2.1. Extração dos óleos essenciais | 75 |
| 4.2.2. Análise da composição dos óleos essenciais | 76 |
| 4.2.3. Identificação dos componentes dos óleos essenciais | 76 |
| 4.2.4. Análise estatística | 77 |
| 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 78 |
| 4.3.1. Extração e rendimento do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES | 78 |
| 4.3.2. Avaliação do perfil do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES | 78 |
| 4.3.3. Avaliação do perfil do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no | |

| | |
|---|------------|
| ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades | 85 |
| 4.4. CONCLUSÃO | 87 |
| CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO APÓS DETERMINAÇÃO POR ICP OES E ICP-MS..... | 88 |
| 5.1. OBJETIVO | 88 |
| 5.1.1. Objetivo Geral | 88 |
| 5.1.2. Objetivos Específicos | 88 |
| 5.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 89 |
| 5.2.1. Instrumentação..... | 89 |
| 5.2.2. Materiais e Reagentes | 90 |
| 5.2.3. Preparo das amostras | 90 |
| 5.2.4. Análise estatística | 91 |
| 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 92 |
| 5.3.1. Características de desempenho dos métodos..... | 92 |
| 5.3.2. Avaliação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES | 98 |
| 5.3.3. Avaliação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades..... | 107 |
| 5.4. CONCLUSÃO | 111 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO GERAL | 113 |
| CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 114 |
| APÊNDICE A: CÁLCULO DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIPERINA..... | 125 |

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) é uma das especiarias mais consumidas e comercializadas no mundo, sendo cultivada em várias regiões tropicais, principalmente no Vietnã, Indonésia, Brasil e Índia, sendo que desde 2018, o Brasil se tornou o segundo maior produtor, ficando apenas atrás do Vietnã (FAO, 2021). Essa especiaria é amplamente utilizada no preparo e processamento de alimentos como condimento e, por apresentar componentes bioativos em seus frutos, a pimenta-do-reino também é utilizada na indústria farmacêutica na produção de princípios ativos, capazes de auxiliar no tratamento ou combate a doenças (Nair, 2011; Tasleem et al., 2014).

No Brasil, segundo dados da Produção Agrícola Municipal divulgados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção em 2019 foi de 109 mil toneladas, sendo os principais estados produtores de pimenta-do-reino o Pará, que foi o maior produtor até 2017 e o Espírito Santo, que em 2018 se tornou, pela primeira vez, o maior produtor de pimenta-do-reino nacional (IBGE, 2021).

A cultura da pimenta-do-reino tem assumido grande importância social e econômica no Brasil e, conseqüentemente, no Espírito Santo, pois a maioria das áreas de plantio da pimenta-do-reino são de agricultura familiar. Por se tratar de um produto de exportação, a cultura também é uma das mais rentáveis para o Estado, alcançando elevado preço no mercado internacional (Lemos et al., 2014).

Contudo, o mercado externo exige que a qualidade da pimenta-do-reino atenda algumas especificações, a fim de assegurar que sejam ofertados aos consumidores, produtos que apresentam o mínimo de contaminantes, como elementos potencialmente tóxicos e resíduos de pesticidas e, portanto, seguros ao consumo humano (Chai & Elie, 2013; Jacxsens et al., 2016; Krause et al., 2020). Outra especificação exigente pelo mercado externo para a avaliação da qualidade da pimenta-do-reino é a avaliação do seu sabor e odor. Os principais componentes responsáveis por essas características da pimenta-do-reino são a piperina, um alcaloide natural que contribui principalmente para sua pungência, e seus compostos voláteis, responsáveis pelo seu odor característico (Peter, 2012).

A quantidade de piperina, assim como os compostos presentes no óleo essencial, existentes na pimenta-do-reino, podem variar por diversos fatores, como o

tipo de cultivar, o clima, as condições de cultivo e processamento, o tempo de estocagem e a localização geográfica (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). No processamento da pimenta-do-reino, a etapa de secagem é necessária para a retirada da umidade e, assim, prevenir deterioração por ação microbiana e, conseqüentemente, produção de toxinas, além de minimizar o ataque de pragas e facilitar o armazenamento e distribuição (Lemos et al., 2014). Entretanto, a etapa de secagem pode provocar alterações físico-químicas na pimenta reduzindo sua qualidade, como na aparência, principalmente na coloração, odor, modificações qualitativas e quantitativas dos compostos voláteis e incorporações de certos contaminantes. Logo, o cuidado durante a etapa de secagem da pimenta-do-reino é de fundamental importância (Lopes, 2014).

No Brasil, a etapa de secagem da pimenta geralmente é realizada de duas maneiras, natural ou artificial. A secagem natural é um processo de baixo custo, sendo realizada ao sol, sob condições higiênicas para evitar a contaminação da pimenta por fungos e bactérias. A secagem artificial ou mecânica é realizada em equipamentos, tais como fornalhas, a partir dos quais é forçada a passagem de ar quente oriundo de alguma fonte de calor. Essas fornalhas utilizadas podem ser de fogo direto ou com aquecimento indireto. A secagem artificial tem a vantagem de reduzir o tempo do processo, além de viabilizar esse processo em regiões úmidas e em períodos de chuvas. Entretanto, se conduzida de forma inadequada, pode comprometer a qualidade do produto (Nair, 2011; Serrano et al., 2008; Vinha & Lima, 2018).

Com o objetivo de contribuir com o conhecimento acerca da qualidade química da pimenta-do-reino produzida no Espírito Santo, o presente estudo avaliou o teor de piperina, o perfil do óleo essencial e a composição elementar. Além de comparar com as pimentas-do-reino provenientes de outras localidades. Dessa forma, a presente tese foi estruturada em 7 capítulos, no primeiro é apresentado uma revisão bibliográfica dos principais temas abordados na tese, o segundo apresenta a área de estudo, ou seja, uma descrição das amostras, campanhas e local de coleta. Nos capítulos 3, 4 e 5 apresentam aspectos relacionados às análises de piperina, do perfil do óleo essencial e da composição elementar, respectivamente. No capítulo 6 é apresentado a conclusão geral do trabalho. E, por fim, no capítulo 7 são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas neste trabalho.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos gerais da Pimenta-do-Reino

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) (Figura 1) é uma das especiarias mais consumidas e comercializadas no mundo, amplamente utilizada como condimento no preparo e processamento de alimentos. Além disso, por apresentar componentes bioativos em seus frutos, como os alcaloides e terpenóides, a pimenta-do-reino também é utilizada na indústria farmacêutica devido suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Nair, 2011; Tasleem et al., 2014).



Figura 1. Espiga de pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal.

Nativa da costa do Malabar, no sudoeste da Índia, a pimenta-do-reino foi introduzida inicialmente nas ilhas da Indonésia. Depois disso, foi levada para várias ilhas do Pacífico, países do sudoeste Asiático, África tropical e América. Atualmente, a pimenta é cultivada por volta de 26 países (Ravindran, 2006).

No Brasil, foi introduzida no século XVII, no entanto, a pimenteira-do-reino foi estabelecida como cultivo somente em 1933, quando imigrantes japoneses chegaram ao estado do Pará trazendo mudas da cultivar Kuching, que no Brasil denominou-se Cingapura. Assim, iniciou-se a produção comercial da pimenta-do-reino, principalmente dos tipos preta e branca. O Brasil passou a ser autossuficiente na produção de pimenta-do-reino em 1950 e, atualmente, é um dos maiores produtores mundiais, junto com Vietnã, Indonésia e Índia, ficando em segundo lugar no ano de 2018 (FAO, 2021; Ravindran, 2006).

1.1.1. Botânica e Composição nutricional

A pimenteira-do-reino (Figura 2) é a espécie mais importante do gênero *Piper* pertencente à ordem *Piperales* e família *Piperaceae*. É uma planta tropical de espécie perene, arbustiva e trepadeira. O caule é formado por duas partes distintas: a haste central, que possui raízes adventícias e se originam nos nós, aderindo livremente no suporte e as hastes laterais que são desprovidas de raízes aderentes e cujas gemas originam as flores e frutos (EMBRAPA, 2004).

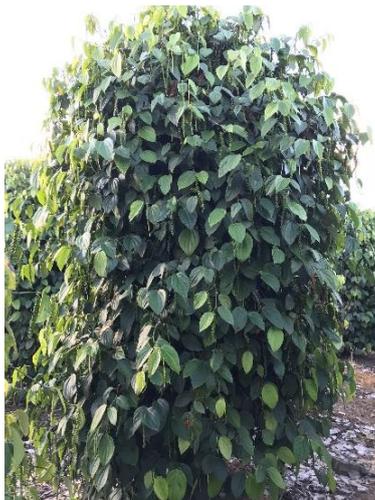


Figura 2. Pimenteira-do-reino. Fonte: Acervo pessoal

A pimenta-do-reino apresenta inflorescência em forma de espiga que pode variar de 8 a 14 cm, e é composta de pequenas flores desprovidas de pétalas e sépalas. O fruto é uma drupa, mas costuma ser chamada de baga. Quando maduro, o fruto possui de 4 a 6 mm de diâmetro e a casca adquire coloração avermelhada. A semente apresenta o endosperma esbranquiçado (EMBRAPA, 2004).

A espécie apresenta mais de 100 cultivares catalogadas na Índia. No Brasil, hoje, há apenas sete cultivares registradas e recomendadas para o plantio no Registro Nacional de Cultivares (RNC) junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): ‘Bragantina’, ‘BRS Apra’, ‘BRS Iaçará’, ‘BRS Kottanadan’, ‘BRS Kuthiravally’, ‘Cingapura’ e ‘Guajarina’. No estado do Espírito Santo, a ‘Bragantina’ ocupa a maior área plantada (Lemos et al., 2014; Ravindran, 2006).

A composição nutricional da pimenta-do-reino, conforme o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2019), é apresentada na Tabela 1. Além de apresentar alto teor de vitaminas e minerais, investigações fitoquímicas realizadas nas

últimas décadas têm revelado que esta especiaria possui uma ampla variedade de metabólitos que se distribuem em diferentes classes de compostos: amidas/alcalóides, propenilfenóis, lignanas, terpenos, flavonas. Quando isolados, esses metabólitos têm apresentado importantes ações biológicas, especialmente anti-inflamatória e antioxidante (N. Ahmad et al., 2012; Butt et al., 2013; Carnevalli & Araújo, 2013).

Tabela 1. Composição Nutricional Média de 100 g de pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de: < <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170931/nutrients> >. Acesso em nov. 2019.

| Composição | Valores |
|-------------------------|----------------|
| Água (g) | 12,46 |
| Valor Energético (kcal) | 251 |
| Proteína (g) | 10,39 |
| Gordura totais (g) | 3,26 |
| Carboidratos (g) | 63,95 |
| Fibras (g) | 25,3 |
| Açúcares (g) | 0,64 |
| Cálcio (mg) | 443 |
| Ferro (mg) | 9,71 |
| Magnésio (mg) | 171 |
| Fósforo (mg) | 158 |
| Potássio (mg) | 1329 |
| Sódio (mg) | 20 |
| Zinco (mg) | 1,19 |
| Tiamina (mg) | 0,108 |
| Riboflavina (mg) | 0,180 |
| Niacina (mg) | 1,143 |
| Vitamina B6 (mg) | 0,291 |
| Ácido Fólico (µg) | 17 |
| Vitamina A (µg) | 27 |
| Vitamina E (mg) | 1,04 |

1.1.2. Cultivo e Processamento da Pimenta-do-reino

Para o cultivo da pimenta-do-reino são necessárias algumas condições propícias, como, clima quente e úmido, temperatura variando de 23 a 28 °C, precipitação volumétrica entre 1500 e 3000 mm/ano e umidade relativa do ar acima de 80%, além de solos que apresentem boa drenagem. Por ser uma planta trepadeira, a pimenteira requer suporte (tutores) como apoio para fixação das raízes adventícias para que possam ser conduzidas. Os tutores podem ser mortos (estacas de caules) ou vivos. Os tutores mortos são os mais utilizados no ES, como a estaca de eucalipto imunizada e estacas de *Mimosa caesalpiniaefolia*, conhecida como sansão-do-campo. Já os tutores vivos, como as árvores gliricídia (*Gliricídia sepium*) e nim (*Azadirachta indica*) são mais empregados por pequenos e médios produtores (Duarte et al., 2006; EMBRAPA, 2004).

É no início da estação chuvosa que ocorre a florada das pimenteiras, sendo o pico entre os meses de janeiro e março. Já a maturação dos cachos da pimenteira ocorre de seis a oito meses após o pico da florada. Com isso, a colheita é realizada em três épocas do ano: entre junho e julho é feita a primeira colheita oriundos da florada ocorrida em janeiro; entre agosto e setembro é feita a segunda colheita; e entre outubro e novembro é realizada a terceira e última colheita proveniente da floração tardia (Serrano et al., 2008).

Após a maturação, as espigas são colhidas manualmente, uma a uma, e depositadas em sacos de aniagem ou de polipropileno trançado. Em seguida os frutos são debulhados manualmente ou mecanicamente, para posterior etapa de beneficiamento.

A pimenta-do-reino, dependendo do estado de maturação, pode ser processada de quatro formas diferentes: a preta, a branca, a verde e a vermelha. A pimenta-do-reino preta é a pimenta em grão coletada antes da completa maturação. Os grãos apresentam casca enrugada de coloração preta, após terem sido submetidos à secagem natural ou artificial. A pimenta-do-reino branca é a pimenta colhida madura, que é descascada antes de ser submetida à secagem. A pimenta-do-reino verde é a pimenta em grão coletada no estágio imaturo, apresentando coloração verde e submetida ao processo de conservação em salmoura. E a pimenta-do-reino vermelha é a pimenta em grão coletada no estágio de maturação completa e submetida a processo de conservação semelhante a pimenta-do-reino verde

(EMBRAPA, 2004).

No processamento das pimentas-do-reino preta e branca, os frutos passam pela etapa de secagem. Essa etapa pode ser realizada naturalmente ou por meio de secagem artificial, utilizando secadores a lenha ou a diesel. Após secos, os grãos são submetidos à ventilação para remoção das impurezas, galhos, poeira e pimenta chocha (Lemos et al., 2014).

Em seguida, as pimentas secas devem ser embaladas em sacos de polipropileno de 50 kg e armazenadas, preferencialmente, em locais de alvenaria fechados, para evitar a entrada de animais, como ratos, morcegos e répteis. Além disso, o local deve possuir boa ventilação e boas condições de higiene (Lemos et al., 2014). Na Figura 3 é apresentado o resumo do processo produtivo da pimenta.

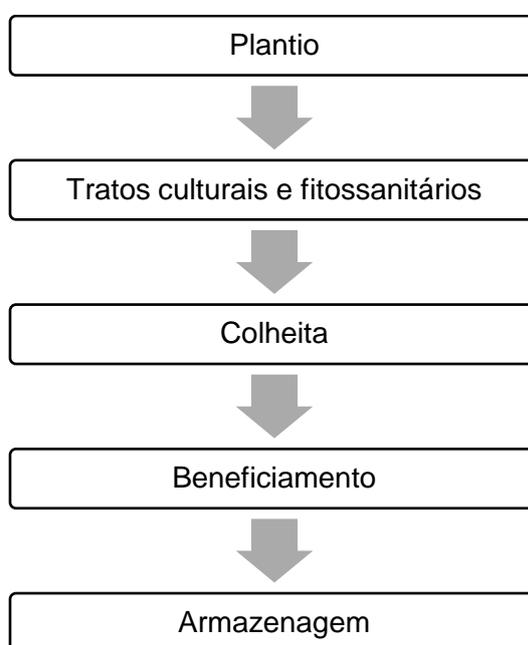


Figura 3. Resumo do processo de produção de pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de: < <http://www.fao.org/3/a-au148e.pdf>>. Acesso em nov. 2019.

1.1.2.1. Etapa de secagem da pimenta-do-reino

A etapa de secagem realizada durante o beneficiamento é necessária para a retirada da umidade e, assim, prevenir deterioração por ação microbiana e, conseqüentemente, produção de toxinas, minimizar o ataque de pragas e facilitar o armazenamento e distribuição. Mas, é nessa etapa que a pimenta-do-reino pode acabar sendo contaminada por *Salmonella sp.* e por coliformes fecais, tornando o produto impróprio para o consumo. A principal forma de contaminação ocorre durante

o processo da secagem ao sol, se a pimenta ficar exposta diretamente ao chão, na presença de animais domésticos (como galinhas, porcos, cães e gatos) e animais silvestres, que podem contaminar por meio da urina, das fezes e das pisadas. Os trabalhadores durante a etapa de secagem podem também ser agentes de contaminação, ao pisarem com sapatos inadequados (Lemos et al., 2014).

Para a prevenção dessas contaminações as boas práticas agrícolas (BPA) devem ser adotadas, além do controle durante a etapa de secagem. Outra forma, para reduzir os contaminantes, é utilizar a etapa de branqueamento, adotado em muitos países. No branqueamento, as pimentas, antes da secagem, são mergulhadas em água fervente por alguns minutos. Esse processo limpa completamente o produto de todas as partículas de poeira aderentes, excrementos de pássaros e outras partículas estranhas. E fornece também uma cor preta mais uniforme ao produto e acelera o processo de secagem (Peter, 2012; Ravindran, 2006).

A qualidade da pimenta-do-reino pode ser avaliada pelo fator organoléptico e suas características físicas. O odor e o sabor transmitidos pelo óleo essencial da pimenta-do-reino são de extrema importância quando vendida para fins culinários. Entretanto, a etapa de secagem pode provocar alterações físico-químicas, quanto na aparência da pimenta, reduzindo sua qualidade, como na coloração, odor, modificações qualitativas e quantitativas nos compostos voláteis e incorporações de certos contaminantes. Logo, o cuidado durante a etapa de secagem da pimenta-do-reino é de fundamental importância (Lopes, 2014).

A etapa de secagem da pimenta pode ser realizada de duas maneiras: secagem natural ou artificial. A secagem natural, normalmente, é realizada em terreiros abertos (NT) durante 3 a 5 dias, dependendo das condições climáticas da região. A fim de obter um produto seco de qualidade, as pimentas não devem ser secas diretamente no chão, mas espalhadas sobre lonas de polietileno ou áreas cimentadas (Figura 4). Neste processo há grande risco de contaminação por excretas de animais e insetos devido ao local ser de fácil acesso para esses desses vetores (Nair, 2011; Serrano et al., 2008).

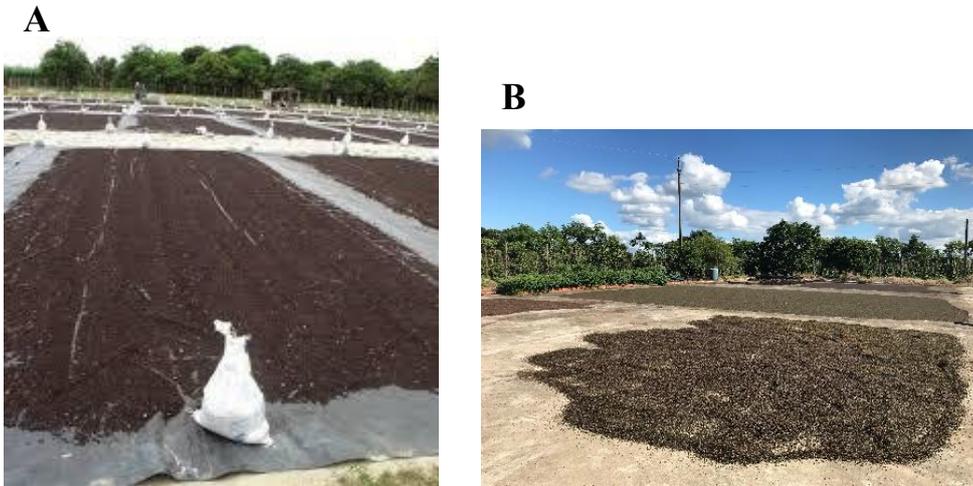


Figura 4. Secagem Natural em Terreiro da pimenta-do-reino: (A) em lona; (B) – área cimentada. Fonte: (A) <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108271/1/Folder-Colheita-Pimenta.pdf>>. Acesso em nov. 2019. (B) Acervo Pessoal.

Um outro método de secagem natural é por meio de uma estufa (NE). Esta possui uma estrutura em madeira com cobertura de plástico transparente ao qual a temperatura interna pode chegar a ser 35°C mais alta que a do ambiente externo, facilitando assim a secagem. Como pode ser visto na Figura 5, dentro da estufa o produtor pode dispor as pimentas-do-reino na altura do chão, sob lona de polietileno ou cimento, reduzindo o risco de contaminação por excretas de animais e insetos diversos. Porém, ainda pode haver contaminação da pimenta a partir dos calçados ou pés dos trabalhadores, como na secagem em terreiro (Brandão, 2008).



Figura 5. Secagem natural em estufa da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal.

Para eliminar o problema da contaminação pelos calçados dos trabalhadores e o acesso de animais, alguns produtores optam pela utilização do jirau, estrutura que consiste em uma tela de sombreamento de malha estreita suspensa a cerca de 80 cm do solo ou uma adaptação da mesma, com estrutura de madeira e forro de plástico ou lona (Figura 6). O jirau pode ser utilizado a céu aberto (conhecido como terreiro suspenso) ou em estufa. Entretanto, não é muito utilizado pelos produtores de pimenta-do-reino (EMBRAPA, 2004).



Figura 6. Secagem natural em estufa com estrutura de jirau adaptada. Fonte: Captura de tela do vídeo disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=e1wsDe_bldk>. Acesso em nov. 2019.

Em relação à secagem artificial ou mecânica, é realizada em equipamentos a partir dos quais é forçada a passagem de ar quente oriundo de alguma fonte de calor, como indução elétrica ou queima de diesel ou lenha. As fomalhas utilizadas podem ser de fogo direto ou com aquecimento indireto (Serrano et al., 2008; Silva et al., 2014).

Na secagem mecânica com fogo direto (MFD), o ar quente presente na fomalha junto com a fumaça proveniente da queima de diesel ou lenha é direcionado para o secador sem a presença de filtros (Silva et al., 2014). Na Figura 7 temos um exemplo da estrutura necessária para este método de secagem.



Figura 7. Secador para método de fogo direto da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal.

Na secagem mecânica com fogo indireto (MFI), a fumaça proveniente da queima da lenha ou combustível é eliminada por uma chaminé com saída para a parte externa do ambiente onde está o maquinário. Dessa forma, a fumaça não entra em contato com os grãos presentes no secador. O aquecimento dos grãos é feito de forma indireta, ou seja, o ar de secagem é forçado para dentro dos dutos através de uma turbina e na parte externa destes dutos é feita a passagem do ar quente proveniente da queima da fornalha. As paredes dos dutos funcionam como trocadores de calor, aquecendo o ar de secagem sem a presença de contaminantes da fumaça (Serrano et al., 2008; Silva et al., 2014). A estrutura utilizada neste método está demonstrada na Figura 8.



Figura 8. Secador para método de fogo indireto da pimenta-do-reino. Fonte: Acervo Pessoal.

A secagem por meio de secadores tem a vantagem de reduzir o tempo de secagem, viabilizando-a mesmo em regiões úmidas e em períodos de chuvas, reduzindo a interferência de condições climáticas sobre o processo. Contudo, se conduzida de forma inadequada, pode comprometer a qualidade do produto. Em secadores, principalmente os que usam o sistema de aquecimento direto, devem-se atentar para a temperatura de secagem, visto que a temperatura do ar pode ultrapassar 120°C e, com isso, pode ocorrer a perda da qualidade final do produto. O ideal é que a temperatura dos grãos permaneça entre 40 e 70°C até que os mesmos atinjam o grau de umidade necessário para o armazenamento (Serrano et al., 2008).

Conforme a norma da Associação Americana de Comércio de Especiarias (ASTA), o teor máximo de umidade deve ser de 12% ($m\ m^{-1}$) para evitar que as

pimentas apresentem crescimento bacteriano e fúngico durante a etapa de armazenamento e transporte (ASTA, 2016).

1.1.3. Conjuntura econômica e produtiva da pimenta-do-reino

A cultura da pimenta-do-reino tem assumido grande importância social e econômica no Brasil, pois a maioria das áreas de plantio da pimenta-do-reino são de agricultura familiar. Por se tratar de um produto de exportação, a cultura também é uma das mais rentáveis para o estado alcançando elevado preço no mercado internacional (Lemos et al., 2014).

Em 2019 os maiores produtores mundiais de pimenta-do-reino foram Vietnã com 264 mil toneladas, seguido do Brasil com 109 mil toneladas, Indonésia com 88 mil toneladas e em quarto lugar a Índia com 66 mil toneladas (FAO, 2021).

Segundo dados da Produção Agrícola Municipal divulgados pelo IBGE, a produção nacional em 2019 foi de 109 mil toneladas, sendo os principais estados produtores de pimenta-do-reino o Pará, que foi o maior produtor até 2017 e o Espírito Santo, que em 2018 se tornou, pela primeira vez, o maior produtor de pimenta-do-reino do Brasil (Figura 9) (IBGE, 2021).

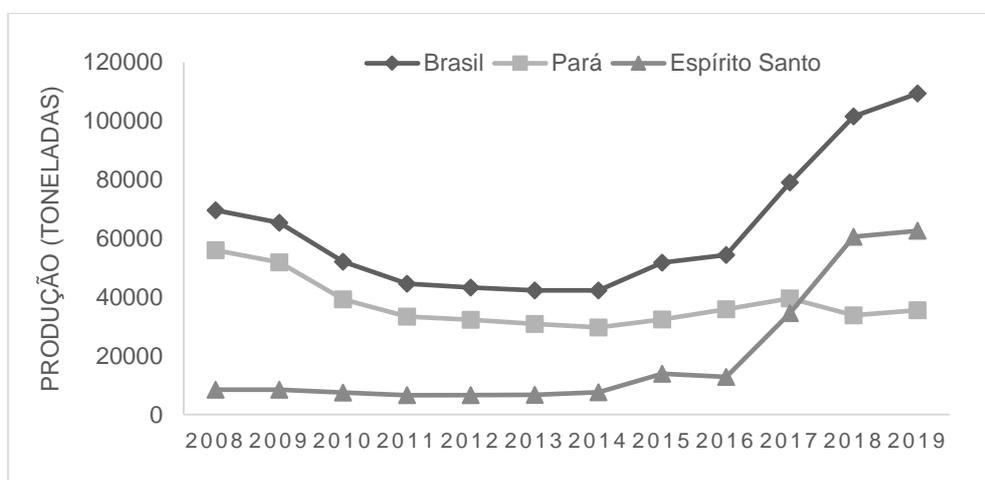


Figura 9. Histórico da produção de pimenta-do-reino no Brasil no período de 2008 a 2019. Fonte: IBGE, 2021.

No Espírito Santo, os plantios se concentram na região norte do estado, sendo o município de Linhares o pioneiro no cultivo e o município de São Mateus o maior produtor estadual, respondendo por aproximadamente 40% da produção total. Por isso a necessidade de estudos envolvendo a pimenta-do-reino, principalmente

relacionado a sua qualidade, como o teor de piperina, a composição do óleo essencial e composição elementar.

1.2. Piperina

A amida natural piperina (Figura 10), classificada como uma piperamida, está presente em diferentes espécies do gênero *Piper*, sendo mais abundante na *Piper nigrum* L. É o principal metabólito secundário (alcaloide) da pimenta-do-reino, encontrado tanto nas folhas e caules quanto nos frutos, onde ocorre em maior proporção. Quando extraída, apresenta rendimentos de 1,7 – 7,4% (m m⁻¹), a partir dos frutos secos da planta e é o principal responsável pela pungência da pimenta-do-reino. O teor de piperina, como a maioria das substâncias produzidas pela planta, também é influenciado por muitos fatores ambientais, como clima, local de origem e as condições de crescimento (Peter, 2012).

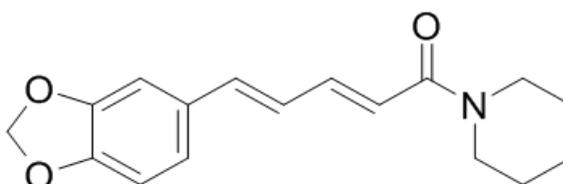


Figura 10. Estrutura química da piperina

A piperina foi isolada pela primeira vez em 1819 pelo químico e físico Hans Christian Oersted, como uma substância cristalina amarela com um ponto de fusão de 128 – 130°C (Ravindran, 2006). Foi identificada posteriormente como piperilpiperidina, com fórmula química C₁₇H₁₉NO₃ e com nome IUPAC 1-[5-(1,3-benzodioxo-5-ila)-1-oxo-2,4-pentadienila] piperidina (Gorgani et al., 2017a).

A piperilpiperidina existe como quatro estruturas isoméricas: piperina (*trans-trans*), isopiperina (*cis-trans*), chavicina (*cis-cis*) e a isochavicina (*trans-cis*). Entretanto, os três isômeros geométricos da piperina praticamente não apresentam pungência e juntos contribuem com cerca de 1% para o conteúdo total dos isômeros de piperina nas pimentas-do-reino (Kozukue et al., 2007). Posteriormente, cinco novos alcaloides foram identificados em extratos de pimenta apresentando um certo grau de pungência, são eles piperetina, piperilina, piperoleína A e B e piperanina. No entanto, a contribuição geral desses alcaloides para a pungência da pimenta é muito pequena, assim o teor de piperina é tomado como uma medida da pungência total da pimenta

(Ravindran, 2006).

Além da pungência, a piperina apresenta propriedades biológicas importantes que possibilita o seu uso da pimenta-do-reino para fins medicinais, como apresentado a seguir.

1.2.1. Atividades biológicas da piperina

Na medicina tradicional chinesa e indiana, a pimenta-do-reino é descrito como uma substância ativa devido suas diversas propriedades farmacológicas. Em forma de chá foi utilizada para aliviar a artrite, náuseas, febre, enxaqueca, má digestão, infecções na garganta e até mesmo coma (Parthasarathy et al., 2008). Também foi usada para melhorar a circulação do sangue, aumentando o fluxo de saliva e estimulando o apetite, e como um antídoto contra picada de cobra e escorpião (Nair, 2011). Esses efeitos benéficos da pimenta-do-reino são atribuídos principalmente, mas não exclusivamente, à presença do seu composto majoritário, a piperina.

Investigações mostraram que a piperina possui diversas atividades biológicas, como antimicrobiana (Reddy et al., 2004), anti-inflamatória (Pradeep & Kuttan, 2004), antiparasitária (doença de Chagas e leishmaniose) (Ferreira et al., 2011; Ribeiro et al., 2004), anticarcinogênico (Vellaichamy et al., 2009), entre outras (Gorgani et al., 2017a).

Considerando outros aspectos farmacológicos, a literatura descreve o aumento da biodisponibilidade de diversos fármacos, tais como o propranolol e fenitoína (Bano et al., 1991), nevirapina (Kasibhatta & Naidu, 2007) e nimesulida (Gupta et al., 2000) na presença de piperina. Ou seja, a utilização de espécies *Piper spp.*, seja na dieta tradicional bem como em formulações à base de plantas associado aos fármacos podem ser responsáveis pelo aumento da biodisponibilidade de fármacos.

1.2.2. Determinação do teor de piperina

Devido à importância da piperina no uso culinário e sua ampla atividade biológica, a sua determinação por meio de um método simples, preciso, exato e de baixo custo é necessário para a indústria alimentícia e farmacêutica.

Em 2007, Nobuyuki Kozukue e colaboradores determinaram o teor da piperina e de seus isômeros em amostras de pimenta-do-reino moídas originária dos Estados Unidos da América e da Coreia. Os compostos foram extraídos com etanol assistidos por ultrassom. Os níveis de piperina entre os produtos foram bastante semelhantes,

variando de 10,17 a 11,68% (m m⁻¹) (Kozukue et al., 2007).

Em 2009, Xiaoji Cao e colaboradores desenvolveram um método de extração assistida por ultrassom baseado em líquido iônico (ILUAE) para a extração da piperina a partir de pimenta-do-reino branca em pó comprada em uma loja local (Hangzhou, China). Comparado com a extração convencional de refluxo térmico e com extração assistida com ultrassom utilizando metanol como solvente, a abordagem otimizada obteve a maior eficiência de extração (de 1,950% para 3,577%) (Cao et al., 2009).

Em 2014, Sachin S. Rathod e colaboradores desenvolveram um método para aumentar o rendimento de piperina usando extração assistida por ultrassom (EAU) a partir de frutos de *Piper longum* comprados no mercado local (Mumbai, Índia) de especiarias. Os efeitos de vários fatores como solvente, tempo de extração, relação sólido/solvente, ciclo de trabalho, frequência de ultrassom, potência de ultrassom e temperatura no rendimento de piperina foram investigados e otimizados. O rendimento máximo de piperina (5,8 mg g⁻¹) de *Piper longum* em pó foi obtido em condições de EAU otimizadas, com etanol utilizado como solvente de extração. Os resultados experimentais revelaram a vantagem da EAU sobre os métodos tradicional de extração em solvente por batelada e extração com aparato Soxhlet. O tempo de extração foi reduzido em 8h de extração por solvente em batelada e 4h extração com aparato Soxhlet para 18 min nos EAU, com aumento do rendimento de extração de piperina. Os rendimentos de extração da piperina obtidos a partir dos métodos de extração por solvente em batelada e extração com aparato Soxhlet foram de 1,67 mg g⁻¹ e 0,98 mg g⁻¹, respectivamente, que foram muito inferiores aos resultados otimizados dos EAU (Rathod & Rathod, 2014).

Em 2016, Sayantani Dutta e Paramita Bhattacharjee otimizaram, a partir de um planejamento experimental, a extração supercrítica de dióxido de carbono assistida por enzimas (α -amylase) para a obtenção de um extrato com maior teor de piperina. As amostras de pimenta-do-reino foram compradas do Conselho de Especiarias (Cochin, Índia). As condições otimizadas obtidas foram: 20 g de pimenta-do-reino, diâmetro médio de partícula de 0,42 mm, 300 bar, 60°C, tempo de extração de 45 minutos e vazão de 2 L min⁻¹ de CO₂ gasoso, extraíndo 1,32 ± 0,06 mg g⁻¹ de pimenta-do-reino (Dutta & Bhattacharjee, 2016).

Em 2017, Leila Gorgani e colaboradores utilizaram a abordagem de extração sequencial assistida por micro-ondas/ultrassom para a extração da piperina em

amostras de pimenta-do-reino compradas no mercado local (Mashhad, Irã). Foi considerado o efeito de vários fatores, tais como solvente de extração, tamanho de partícula de pimenta, relação solvente/sólido, potência e tempo de micro-ondas e temperatura e tempo de ultrassom para um melhor rendimento de extração da piperina. O rendimento máximo de extração foi de 46,6 mg g⁻¹, que foi obtido usando etanol como solvente no tamanho de partícula de 0,15 mm, relação solvente para sólido de 20:1, potência de micro-ondas de 100 W por 1 min e temperatura ultrassônica de 50 °C por 30 min. Este rendimento de extração foi maior do que aqueles obtidos por extração Soxhlet (39,1 mg g⁻¹), assistida por micro-ondas (38,8 mg g⁻¹) e assistida por ultrassom (37,0 mg g⁻¹) (Gorgani et al., 2017b).

Em 2018, Olusegun Abayomi Olalere e colaboradores avaliaram os parâmetros de otimização na extração em refluxo por micro-ondas de piperina em pimenta-do-reino. As amostras foram compradas no mercado local (Sarawak, Malásia). O efeito do tempo de irradiação, nível de potência de micro-ondas, tamanho de partícula da amostra e razão amostra/solvente foram testados. Os resultados obtidos colocaram a condição ótima de extração em 90 min de tempo de irradiação, 350 W de potência de micro-ondas, 0,1 mm de tamanho de partícula e 1:12 de relação amostra/solvente. Sob esta condição ótima, o teor máximo de piperina extraído foi de 5,64 ± 0,01% (m m⁻¹) (Olalere et al., 2018).

Diante da revisão acima, é possível observar que a maioria dos estudos envolvendo a determinação do teor de piperina em amostras de pimenta-do-reino faz uso de métodos de extração sólido-líquido assistida por ultrassom, utilizando etanol como solvente. É possível observar também a variação no teor de piperina nas amostras analisadas e a falta de trabalhos publicados de determinação do teor de piperina nas amostras de pimenta-do-reino do Brasil.

1.3. Óleos essenciais

Óleos essenciais também chamado de óleos voláteis, óleos éteres ou essências são produtos do metabolismo secundário dos vegetais. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríficas. Em geral, não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES et al., 2010). De acordo com a ISO 9235:1997 (International Standard Organization), os óleos essenciais são produtos obtidos de parte de plantas por meio

de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (ISO, 1997).

Óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras. Eles podem estar estocados e, conseqüentemente, ser extraídos em certos órgãos, como nas flores (laranjeira), folhas (capim-limão e eucalipto), cascas dos caules (canela), madeira (pau rosa), raízes (vetiver), frutos (pimenta-do-reino), rizomas (cúrcuma e gengibre) ou sementes (noz-moscada) (SIMÕES et al., 2010).

Os compostos voláteis desempenham múltiplas funções nas plantas, conferindo fortes características adaptativas na seleção ambiental para a sua sobrevivência, como atrair agentes polinizadores. Muitas vezes a emissão destes compostos voláteis é máxima quando o pólen está maduro e pronto para ser dispersado. Por outro lado, certos compostos podem afastar animais herbívoros, fazendo com que estes percam o apetite pela planta (SIMÕES et al., 2010).

Devido às frequentes atividades biológicas, os óleos essenciais despertam interesse em diversas indústrias, tais como alimentícia, farmacêutica, cosméticos, perfumaria, higiene e limpeza. Na área de alimentos, têm sido utilizados para controle microbiológico e de patógenos e no aumento da vida útil do alimento, além de conferir sabor e odor. Na farmacêutica é utilizada como matéria-prima para diversos medicamentos. São utilizados na composição de perfumes e em produtos de higiene e de limpeza. Os óleos essenciais também são utilizados "*in natura*" em aromaterapia, na medicina alternativa, e até mesmo para aromatização de ambientes (Preedy, 2016).

A composição dos óleos é determinada por fatores genéticos, porém os fatores ambientais podem causar variações significativas em seus constituintes, como a etapa do ciclo vegetativo em que o vegetal se encontra, o quimiotipo (raça química) da planta, época da colheita, altitude, temperatura, umidade relativa, tempo de exposição solar, grau de hidratação do solo, a presença de micronutrientes e até mesmo o modo de secagem do material vegetal, dentre outros fatores, podem influenciar a composição e o teor do óleo produzido (SIMÕES et al., 2010).

O número de compostos de um óleo essencial costuma variar de 20 a 200, sendo classificados de acordo com a sua concentração: constituintes majoritários (de 20 a 95%), constituintes secundários (1 a 20%) e componentes-traço (abaixo de 1%).

Dentre eles, hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos com enxofre. E, geralmente, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (Betts, 2001; Pichersky et al., 2006; SIMÕES et al., 2010).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída principalmente de derivados de terpenoides ou fenilpropanoides, sendo que os primeiros prevalecem. Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes (Figura 11): a rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar este ácido e, posteriormente, origina o difosfato de isopentenila (IPP); e através da rota do metileritriol-4-fosfato (MEP), onde o gliceraldeído 3-fosfato e piruvato levam à formação do difosfato de dimetilalila (DMAPP). Esses dois precursores irão sofrer condensação, originando diferentes classes de terpenoides, que costumam apresentar um número de carbono múltiplo de 5. Sendo os monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), formados pela junção de duas e três unidades isoprênicas, respectivamente, são os principais terpenoides presentes nos óleos.

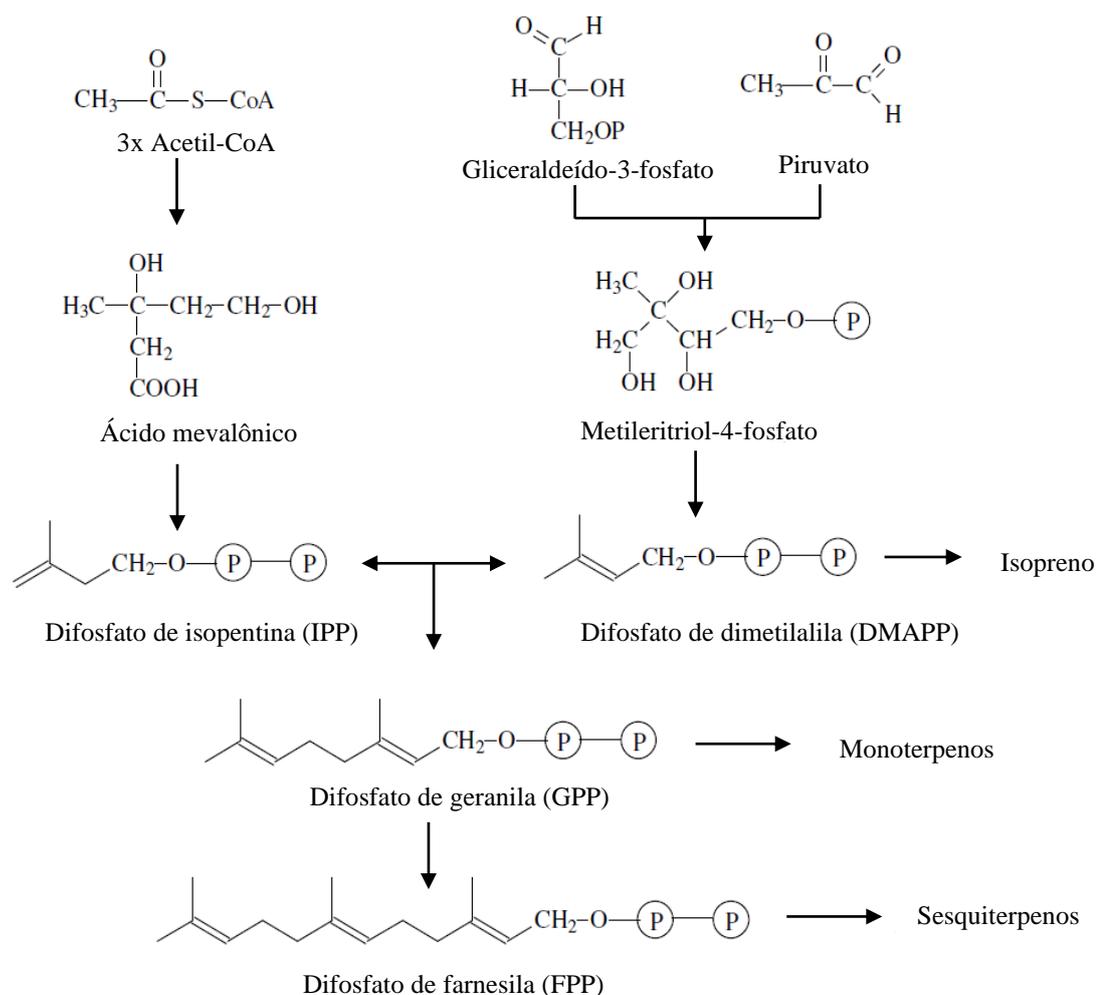


Figura 11. Esquema simplificado da biossíntese de terpenos nas plantas. Fonte: (Taiz & Zeiger, 2002)

1.3.1. Óleos essenciais da pimenta-do-reino

Os grãos da pimenta-do-reino são utilizados principalmente para conferir sabor aos alimentos, enquanto os óleos essenciais da pimenta-do-reino (OE) são empregados nos processamentos de alimentos, saúde e nutrição. No processamento de alimentos têm como função impedir ou retardar a degradação dos alimentos, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. São utilizados também como ingredientes medicinais na indústria farmacêutica, na produção de perfume e até como inseticidas (Meghwal & Goswami, 2012).

O teor de OE na pimenta-do-reino pode variar por diversos fatores, tais como a variedade da pimenta, o tipo de processamento ao qual o material foi submetido (moagem e secagem), além da época de colheita, tempo de estocagem e localização geográfica (SIMÕES et al., 2010). Dentre as principais cultivares plantadas no Brasil, a Cingapura é que apresenta o menor teor de OE, de 2,37% e a Kuthiravally é a que

apresenta o maior teor de OE, de 5,70% (Lemos et al., 2014). Menon e colaboradores (2000) avaliaram o teor e a composição de 4 cultivares populares da Índia 'Karimunda', 'Kalluvally', 'Arakulam munda' e 'Thommankody' por um período de três anos. 'Karimunda' apresentou o maior teor de OE (4,1 - 4,6%), seguido da 'Arakulam munda' com 3,5 - 4,2%. "Kalluvally" teve o menor teor de óleo (1,7 - 2,2%). E 'Thommankody' apresentou de 2,1 a 4,1% de óleo. A explicação para a variação do OE em cada cultivar durante os anos foi devido as variações nas condições agroclimáticas (Menon et al., 2000).

Em 2020, Li e colaboradores avaliaram a composição química e o teor de OE de pimenta-do-reino de 5 províncias do sul da China, para posteriormente avaliar à atividade biológica desses óleos. Os resultados desse estudo demonstram que existem diferenças consideráveis nas composições e teor de OE, variando de 0,538% a 2,079%, e exibiram atividades antioxidantes e antifúngicas notavelmente diferentes (Li et al., 2020).

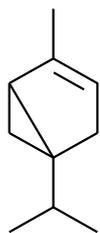
Em 2004, Orav e colaboradores avaliaram o efeito do armazenamento na composição de OE de frutos de *Piper nigrum* L. em diferentes estados de maturação. A pimenta verde obtida por um método de secagem por sublimação apresentou maior quantidade de óleo (12,1 mg g⁻¹) do que a pimenta verde seca ao ar (0,8 mg g⁻¹). Para pimenta-do-reino em grão seca ao ar a quantidade obtida foi de 0,6 mg g⁻¹. Após 1 ano de armazenamento das amostras de pimenta em um recipiente de vidro à temperatura ambiente, a quantidade do óleo da pimenta-do-reino em grão diminuiu para 0,5 mg g⁻¹. Já para as amostras de pimenta-do-reino moída, após um ano de armazenamento, a quantidade de óleo diminuiu cerca de duas vezes. Essas mudanças mostram que a evaporação de compostos mais voláteis, oxidação e outros processos de mudanças químicas podem ocorrer durante o armazenamento da pimenta-do-reino moída (Orav et al., 2004).

Foram identificados cerca de 135 compostos constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos, entre outros nos OEs da pimenta-do-reino. A composição desses constituintes no OE pode ser afetada durante a produção, principalmente pelo método de extração empregado (Polovka & Suhaj, 2010). Quando os OEs de pimenta-do-reino são destilados a vapor geralmente contêm cerca de 70 a 80% de hidrocarbonetos monoterpenos, 20 a 30% hidrocarbonetos sesquiterpenos e menos de 4% de constituintes oxigenados. Os óleos quando extraídos por destilação a vácuo diferem

por conter menos hidrocarbonetos monoterpênicos e mais hidrocarbonetos sesquiterpênicos e constituintes oxigenados. Segundo o autor, a baixa abundância de hidrocarbonetos de sesquiterpênicos e constituintes oxigenados nos óleos destilados a vapor ocorre provavelmente devido ao resultado de uma destilação incompleta e com isso uma menor recuperação desses constituintes com alto ponto de ebulição (Parthasarathy et al., 2008). Ou seja, além da variedade da composição do óleo devido a fatores genéticos e ambientais, o método de extração também pode afetar sua composição.

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta algumas estruturas dos principais componentes encontrados no OE da pimenta-do-reino (Preedy, 2016).

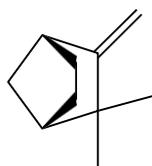
Monoterpenos e Monoterpenos oxigenados



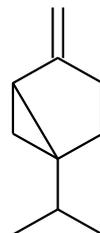
α -tujeno



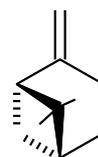
α -pineno



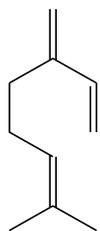
Canfeno



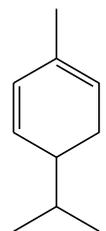
Sabineno



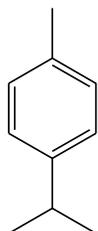
β -pineno



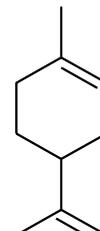
Mirceno



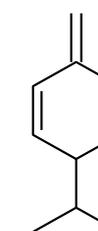
α -felandreno



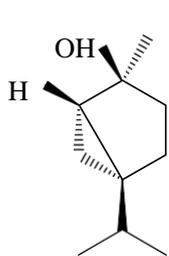
p-cimeno



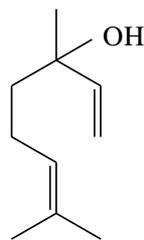
Limoneno



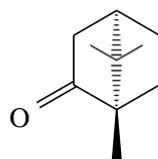
β -felandreno



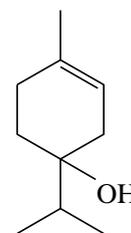
Cis-sabineno hidratado



Linalol

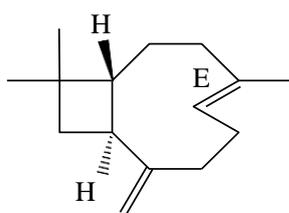


Cãnfora

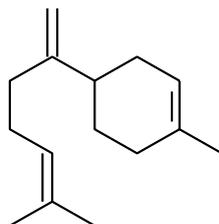


Terpinen-4-ol

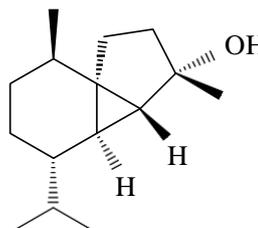
Sesquiterpenos e Sesquiterpenos oxigenados



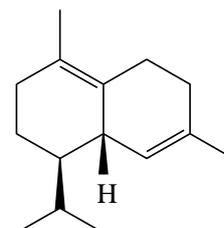
β -cariofileno



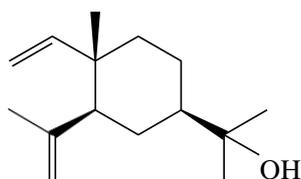
β -bisaboleno



Cubebol



δ -cadineno



Elemol

Figura 12. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo essencial da pimenta-do-reino. Fonte: Adaptado de (Adams, 2017)

Em 2017, Morshed e colaboradores determinaram as características físico-químicas do óleo essencial da pimenta-do-reino cultivada em Bangladesh. A extração do óleo essencial foi realizada usando o aparelho Clevenger. Os compostos químicos foram determinados por GC-MS e algumas características físico-químicas do óleo essencial foram determinadas de acordo com os métodos padrão. Os principais componentes do óleo essencial foram cariofileno (19,12%), limoneno (9,74%) e canfeno (8,44%), β -pineno (8,00%) e 3-Careno (7,08%) (Morshed et al., 2017).

Em 2018, Wang e colaboradores investigaram amostras de óleo extraídas por destilação a vapor de sementes de pimenta-do-reino para comparar o perfil químico de amostras originárias de nove principais países produtores, Malásia (n=1), Sri Lanka (n=2), Madagáscar (n=1), Equador (n=1), Índia (n=4), Vietnã (n=1), Indonésia (n=1), Brasil (n=3), China (n=3) e 6 amostras adquiridas em estabelecimento comercial sem identificação de origem e identificar potenciais marcadores químicos para avaliação da qualidade. Os terpenos dominantes foram β - carofileno (14,7 - 52,5%), 3-careno (0,8 - 21,1%), limoneno (4,4 - 18,7%), α - pineno (1,5 - 7,3%) e β -pineno (1,7 - 9,4%), que apareceu em concentrações significativas em todas as amostras de óleo analisadas. Sabineno foi encontrado em muitas amostras (1,0 - 15,9%), com a exceção das amostras chinesas e malaias (<0,2%). Nenhum composto pode ser claramente identificado como marcadores químicos para distinguir amostras de diferentes países ou aplicar para fins de autenticidade e avaliação da qualidade (M. Wang et al., 2018).

Em 2019, Jayatunga e colaboradores investigaram os parâmetros operacionais de secador de leito de jorro, como temperatura de secagem, velocidade do ar e altura estática do leito na cinética de secagem. As amostras foram coletadas em fazendo localizadas no distrito de Gampaha, Sri Lanka. E para avaliar a qualidade da pimenta-do-reino, extraíram e analisaram o óleo essencial para identificar a melhor temperatura de secagem. A análise do óleo essencial de pimenta-do-reino seca mostrou que a variação do rendimento do óleo com a temperatura de secagem é significativa para temperaturas de secagem de 45 °C a 75°C, sendo 65°C selecionada como a melhor temperatura para a secagem de pimenta-do-reino no secador convencional de leito de jorro. Sob esta investigação, os 10 componentes mais abundantes do óleo essencial de pimenta-do-reino foram: cariofileno (14,792%), d-limoneno (13,724%), óxido de cariofileno (11,531%), α -copaeno (8,191%), (1R)- α -

pineno (6,982%) , α -Pineno (6,854%), α -cubebeno (6,435%), L- β -pineno (5,715%), sabineno (5,608%) e δ 3-p-menteneno (4,827%) (Jayatunga & Amarasinghe, 2019).

Em 2020, Yong-xin Li e colaboradores avaliaram a composição química e as atividades antioxidantes e antifúngicas dos óleos essenciais de pimenta-do-reino preta e branca de cinco províncias diferentes da China. Os óleos foram analisados por GC-MS sendo identificados 19 compostos, entre eles cariofileno (25,58 - 62,23%), 3-careno (não detectado - 26,84%), d-limoneno (4,39 - 25,83%), óxido de cariofileno (0,96 - 8,17%), copaeno (0,92 - 5,04%) e humuleno (1,26 - 4,13%). Os resultados deste estudo demonstram que existem diferenças consideráveis nas composições dos óleos das cinco províncias da China (Li et al., 2020).

Em 2021, Barata e colaboradores avaliaram a composição química das folhas e frutos de oito cultivares de pimenta-do-reino cultivadas no Estado do Pará, Brasil. A hidrodestilação e GC-MS foram empregadas para extrair e analisar os compostos voláteis, respectivamente. Nos frutos foram identificados ao todo 104 compostos, representando 99,45% da composição total do óleo. Hidrocarbonetos monoterpênicos (média de 76,1%) foram predominantes em todas as cultivares, como α -pineno (6,91 - 10,67%), β -pineno (22,61 - 35,05%) e limoneno (21,0 - 31,77%). E o hidrocarboneto sesquiterpênico predominante foi o β -cariofileno (2,22 - 7,84%) (Barata et al., 2021).

Diante da revisão acima, é possível perceber uma escassez de estudos relacionado a composição do óleo essencial da pimenta-do-reino de amostras localizadas no Brasil e conseqüentemente relacionando a sua qualidade sensorial. Além de poucos trabalhos publicados sobre a variação da composição do óleo essencial em função dos diferentes tipos de secagem durante o processamento da pimenta-do-reino.

1.4. Composição elementar na pimenta-do-reino

A composição elementar na pimenta-do-reino está relacionada tanto ao aporte nutricional da planta, que auxilia na síntese dos metabolitos secundários, quanto a uma possível contaminação, que pode conseqüentemente ocasionar a perda de sua qualidade. Assim, conhecer a composição elementar da pimenta é importante para controlar a qualidade e a segurança do consumo.

Alguns elementos químicos, além de serem componentes naturais da planta, também podem ser originados em função de atividades antrópicas. Isso ocorre porque

as plantas absorvem do solo os elementos químicos disponíveis, sem distinção, podendo ser um nutriente ou um elemento potencialmente tóxico. Quando incorporados ao ambiente, o potencial tóxico desses elementos é devido suas diferentes formas químicas, estados de oxidação, concentrações e nível de exposição (Kennish, 1997).

Para as plantas, os elementos podem ser classificados como essenciais e não essenciais. Um elemento essencial é definido como aquele cuja ausência impede uma planta de completar seu ciclo de vida. Recebendo esses elementos, assim como a energia da luz solar, as plantas poderão sintetizar todos os compostos necessários para o crescimento normal. Os elementos minerais essenciais são geralmente classificados como macronutrientes ou micronutrientes, de acordo com sua concentração relativa no tecido vegetal (Taiz & Zeiger, 2002).

Os macronutrientes são os nutrientes absorvidos pelas plantas em maiores quantidades, sua concentração é normalmente expressa em g kg^{-1} de matéria seca, são eles: N, P, K, Ca, Mg e S. Eles também podem ser divididos como macronutrientes primários: N, P e K, e macronutrientes secundários: Ca, Mg e S. Já os micronutrientes são aqueles nutrientes absorvidos pelas plantas em menores quantidades, expresso em mg kg^{-1} de matéria seca, são eles: Fe, Mn, Zn, Cu, B, Cl e Mo (Prado, 2010).

Outra forma de classificação dos elementos essenciais é a partir do seu papel biológico e função fisiológica nas plantas, sendo dividido em quatro grupos básicos: os elementos que formam os compostos orgânicos da planta, como N e S; os que são importantes nas reações de armazenamento de energia ou na manutenção da integridade estrutural, como P, Si e B; os que estão presentes como íons livres ou íons ligados a substâncias como cofatores enzimáticos e na regulação de potenciais osmóticos, como K, Ca, Mg, Cl, Mn e Na; e o quarto grupo são elementos que estão envolvidos em reação redox, como Fe, Zn, Cu Ni e Mo (Taiz & Zeiger, 2002).

Os elementos não essenciais podem ser considerados benéficos ou potencialmente tóxicos. Os elementos benéficos, como o Co, Na, Ni, Se e Si, são elementos que podem estimular o crescimento e o desenvolvimento dos vegetais, mas não são absolutamente necessários. Sua ausência não é considerada um fator limitante (Prado, 2010).

Os elementos potencialmente tóxicos são aqueles que não se enquadram como um nutriente ou como elemento benéfico, como Al, As, Cd, Cr, Hg e Pb. Esses

elementos, mesmo em concentrações traço, podem apresentar alto potencial maléfico ao vegetal, como a inibição de diversos sistemas enzimáticos, diminuição do crescimento, atrofia radicular e até levar o vegetal à morte. Os elementos essenciais podem também, sob certas condições, serem considerados potencialmente tóxicos, a depender da concentração na qual eles se apresentam e do nível de exposição a qual estão sujeitos os seres vivos (Prado, 2010).

Diante disso, é crescente o número de estudos visando a determinação elementar em amostras de materiais vegetais, tais como especiarias, ervas e plantas medicinais, inclusive em amostras de pimenta-do-reino, como será apresentado no item 1.4.2.

1.4.1. Contaminantes inorgânicos na pimenta-do-reino

Contaminações por elementos químicos podem ocorrer durante o desenvolvimento da pimenteira-do-reino, devido ao uso de solos e água de irrigação contaminados (de Santiago-Martín et al., 2020), além do uso de agrotóxicos e fertilizantes (Nunes et al., 2014; Qian et al., 2019). As etapas de processamento dos grãos, como secagem e armazenamento, quando realizados de forma inadequada (Darko et al., 2014; Krause et al., 2020), também podem incorporar contaminantes a planta.

A Resolução RDC 42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos, estabelece os parâmetros de qualidade de acordo com a categoria do alimento. Como não existe uma categoria específica para a pimenta-do-reino, foi adotada como referência nesse trabalho, a categoria Legumes (sementes secas das leguminosas), exceto soja, quanto às concentrações de arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013). Os valores de referência são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Limites Máximo de Contaminantes Inorgânicos (arsênio, cádmio e chumbo) em Legumes (sementes secas das leguminosas) exceto soja. Fonte: (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013)

| Contaminante Inorgânico | Concentração |
|-------------------------|--------------------------|
| Arsênio | 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| Cádmio | 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ |
| Chumbo | 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ |

1.4.2. Determinação elementar em amostras de pimenta-do-reino

Em 2000, Abou-Arab e Abou Donia determinaram as concentrações de Pb, Cd, Cr, Ni, Sn, Zn, Mn, Cu e Fe de 20 tipos de especiarias egípcias e plantas medicinais. Foram analisadas 303 amostras coletadas de áreas de exportação no Egito. As amostras de pimenta-do-reino apresentaram os menores teores de Pb, Cd, Cr e Fe se comparado as outras especiarias. Os resultados revelaram que os teores dos elementos presentes em plantas medicinais e especiarias dependem da espécie e que em parte das amostras analisadas, alguns elementos excederam os níveis máximos permitidos pela legislação local. Isso foi atribuído ao uso de água de irrigação contaminada, à adição de alguns fertilizantes e herbicidas e à contaminação ocorrida durante o seu transporte. Neste trabalho foi sugerido que os resíduos domésticos, atividades industriais, combustível e pneus de automóvel também podem ser fontes significativas de alguns elementos (Abou-Arab & Donia, 2000).

Em 2007, Krejpcio e colaboradores determinaram os teores de Pb, Cd, Zn e Cu nas especiarias e ervas mais frequentemente utilizadas na culinária polonesa. As amostras foram obtidas de mercados locais da região de Wielkopolska, Polônia. Os resultados foram comparados com os limites máximos permitidos pelo ministério da saúde local. Quantidades excessivas de Pb foram encontradas em 40% das amostras de manjeriço, 42% de canela, 25% de segurelha-anual e 6% de cebola desidratada. Níveis aumentados de Cd foram detectados em 20% de manjeriço, 25% de amostras de segurelha-anual e 42% de canela. Todas as amostras de pimenta-do-reino apresentaram valores dentro dos limites permitidos (Suliburska et al., 2007).

Em 2013, De La Calle e colaboradores determinaram as concentrações de P, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn em amostras de ervas e especiarias, incluindo pimenta-do-reino, utilizando extração assistida por ultrassom em combinação com a Fluorescência de Raios X por reflexão total. A análise de discriminante linear juntamente com as concentrações elementares obtidas de 19 plantas permitiu a diferenciação das amostras comerciais correspondentes a flores, frutas e folhas (De La Calle et al., 2013).

Em 2015, Soliman determinou as concentrações de As, Cu, Fe e Zn em amostras de especiarias e ervas compradas diretamente dos mercados locais do Egito. Os resultados mostram que os elementos estão presentes em diferentes concentrações em especiarias e ervas, e que em alguns casos ultrapassaram os

limites máximos permitidos pela legislação. Para a pimenta-do-reino, o valor de Fe encontrado ($452,13 \mu\text{g g}^{-1}$) está acima do recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Os autores sugeriram que esse fato pode estar relacionado a moagem de especiarias em moinhos comerciais que podem contaminar as amostras devido ao desgaste das peças da máquina. E que a verificação de rotina e a análise frequente de alimentos são necessárias para evitar a ingestão além dos limites de tolerância (Soliman, 2015).

Em 2016, Jawad determinou as concentrações de Pb, Cd, Cr, Fe, Mn e Cu em amostras de especiarias e ervas medicinais utilizadas no Iraque. Foram adquiridas 270 amostras diretamente em diferentes mercados localizados em Bagdá, Iraque. Os resultados mostraram que a pimenta-do-reino apresentou as maiores médias de Mn ($81,55 \pm 1,33 \mu\text{g g}^{-1}$) e Cu ($11,61 \pm 0,91 \mu\text{g g}^{-1}$) se comparada as outras especiarias. Em relação aos elementos potencialmente tóxicos, o teor de Pb nas amostras de pimenta-do-reino foi de $5,97 \pm 1,09 \mu\text{g g}^{-1}$ e o teor de Cd foi de $2,22 \pm 0,47 \mu\text{g g}^{-1}$ (Jawad, 2016).

Em 2019, Ahmad e colaboradores determinaram as concentrações de K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cr, Ni, Ti, Cu, Se, Mo, Co, Sr, Ba, Pb, Pt, Sb e Y nas amostras de pimenta-do-reino do Vietnã, Paquistão e Índia com o intuito de avaliar a toxicidade e os riscos associados ao processamento dessas amostras de alimento. Foi observado que a amostra do Vietnã exibiu um maior teor de macronutrientes ($\text{K} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Mn}$) e dos micronutrientes Fe, Cr, Ni, Ti e Cu. Os micronutrientes, Co, Mo e Se apresentaram maiores médias para a amostra do Paquistão. Em relação aos elementos traço, o Vietnã apresentou o maior teor de Sr, Ba e Pb, enquanto Pt, Sb e Y foram novamente abundantes na amostra do Paquistão (R. Ahmad et al., 2019).

Em 2020, Krause e colaboradores determinaram as concentrações de Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Ti, V, Fe e Zn em pimentas-do-reino em grão e moída comercializadas na região da grande Vitória, Espírito Santo, Brasil. A análise dos resultados mostrou que o processo de moagem afetou significativamente a concentração dos elementos Fe, V e Pb nas amostras de alguns dos fabricantes, inferindo que o acréscimo destes elementos pode ser proveniente da forma como é feito o processamento da pimenta-do-reino. Em algumas amostras a concentração de Pb encontrada pelo autores ($0,947 \mu\text{g g}^{-1}$) estava acima dos limites permitidos em alimentos para consumo humano, pela legislação brasileira vigente (Krause et al.,

2020).

Em 2020, Potortì e colaboradores determinaram elementos com concentração maior, menor e traço em diversas especiarias da Sicília (Itália) e Mahdia (Tunísia). A partir da composição elementar, os autores buscaram avaliar possíveis semelhanças de acordo com a origem botânica e origem geográfica, além de avaliar a qualidade e segurança nutricional relacionado ao consumo desses produtos alimentares. As amostras de pimenta-do-reino foram obtidas apenas da Tunísia. Foi observado que o Mn apresentou o teor médio maior para a pimenta-do-reino ($307 \pm 60,5 \mu\text{g g}^{-1}$) se comparado com as outras especiarias. Em relação a segurança alimentar, as concentrações de Pb foram mais baixas nas amostras de pimenta-do-reino ($0,0631 \pm 0,0085 \mu\text{g g}^{-1}$) e as concentrações de As e Cd estavam abaixo do limite de quantificação (Potortì et al., 2020).

Diante da revisão anteriormente apresentada, é possível perceber que, de modo geral, os estudos de determinação elementar em amostras de pimenta-do-reino, envolvem a comparação entre diferentes especiarias, muitas vezes obtidas em mercados locais, onde não há garantia de sua origem geográfica. Trabalhos que envolvem a determinação elementar em amostras de pimenta-do-reino específicas do Brasil são escassos e não permitem uma boa caracterização das pimentas locais. Também faltam trabalhos que correlacionam o processamento da pimenta-do-reino com a sua composição elementar. A Tabela 3 mostra as concentrações de alguns elementos obtidas em amostras de pimenta-do-reino em estudos realizados anteriormente, além da localidade de onde as amostras foram obtidas em cada estudo.

Tabela 3. Comparação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino de diferentes países (concentração média ± desvio padrão).

| Al (µg g ⁻¹) | As (µg g ⁻¹) | B (µg g ⁻¹) | Ba (µg g ⁻¹) | Ca (µg g ⁻¹) | Cd (µg g ⁻¹) | Localidade* | Referência |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------|
| - | - | - | - | - | 1,16 ± 0,55 | Egito | (Abou-Arab & Donia, 2000) |
| - | - | - | - | - | - | Índia | (Singh & Garg, 2006) |
| 167,67 ± 31,13 | - | 3,62 ± 0,91 | - | 2636,97 ± 302,43 | 0,79 ± 0,30 | Turquia | (Özcan & Akbulut, 2007) |
| - | - | - | - | - | 0,04 | Polônia | (Suliburska et al., 2007) |
| - | 0,028 | - | 29,77 | 3140 | ND | Turquia | (Karadaş & Kara, 2012) |
| - | - | - | - | 4967 ± 491 | - | Espanha | (De La Calle et al., 2013) |
| - | - | - | - | - | 2,22±0,47 | Iraque | (Jawad, 2016) |
| - | - | - | - | - | ND | Arábia Saudita | (Seddigi et al., 2016) |
| - | - | - | - | - | 0,093 ± 0,050 | Iraque | (Matloob, 2016) |
| 1770 ± 17 | 0,143 ± 0,004 | - | - | 5570 ± 330 | 0,060 ± 0,031 | Bangladesh | (Rahman et al., 2018) |
| - | - | - | 12,13 ± 4,21 | 1023,96 ± 15,25 | - | Paquistão | (R. Ahmad et al., 2019) |
| - | - | - | 12,94 ± 5,43 | 988,09 ± 19,81 | - | Índia | |
| - | - | - | 21,27 ± 4,97 | 1688,78 ± 12,06 | - | Vietnã | |
| - | ND | - | - | 6370 ± 640 | ND | Tunísia | (Potorti et al., 2020) |
| Co (µg g ⁻¹) | Cr (µg g ⁻¹) | Cu (µg g ⁻¹) | Fe (µg g ⁻¹) | K (µg g ⁻¹) | Mg (µg g ⁻¹) | Localidade* | Referência |
| - | 11,19 ± 1,16 | 8,4 ± 2,18 | 26,96 ± 4,14 | - | - | Egito | (Abou-Arab & Donia, 2000) |
| 0,033 | ND | ND | 76 | 14600 | - | Índia | (Singh & Garg, 2006) |
| - | 5,27 ± 0,24 | 4,78 ± 0,59 | 89,24 ± 11,43 | 10006,04 ± 497,46 | 1486,94 ± 215,76 | Turquia | (Özcan & Akbulut, 2007) |
| - | - | 5,44 | - | - | - | Polônia | (Suliburska et al., 2007) |
| 0,131 | 0,71 | 10,19 | 158 | - | 1380 | Turquia | (Karadaş & Kara, 2012) |
| - | - | 12 ± 4 | 1264 ± 216 | 17797 ± 1749 | - | Espanha | (De La Calle et al., 2013) |
| - | 2,11±019 | 11,61 ± 0,91 | 481,28 ± 2,37 | - | - | Iraque | (Jawad, 2016) |
| ND | 0,3 ± 0,09 | 10,5 ± 0,2 | 144 ± 9,2 | - | - | Arábia Saudita | (Seddigi et al., 2016) |
| 0,412 ± 0,136 | 1,044 ± 0,424 | 8,09 ± 1,34 | 194,1 ± 39,03 | - | - | Iraque | (Matloob, 2016) |
| 0,492 ± 0,018 | 3,04 ± 0,29 | - | 1160 ± 132 | 18800 ± 959 | - | Bangladesh | (Rahman et al., 2018) |
| 1,07 ± 0,69 | 3,57 ± 0,22 | 5,04 ± 0,51 | 135,57 ± 8,73 | 2353,24 ± 19,42 | 662,31 ± 17,75 | Paquistão | (R. Ahmad et al., 2019) |
| 0,78 ± 0,65 | 3,09 ± 0,89 | 9,05 ± 8,87 | 113,67 ± 9,48 | 1910,36 ± 14,51 | 579,65 ± 11,21 | Índia | |
| 1,00 ± 0,66 | 64,81 ± 4,5 | 12,83 ± 5,47 | 699,82 ± 2,11 | 2774,37 ± 0,5 | 1015,72 ± 16,43 | Vietnã | |
| 0,171 ± 0,033 | 0,317 ± 0,024 | 15,2 ± 4,2 | 163 ± 12 | 20300 ± 720 | 2770 ± 40 | Tunísia | (Potorti et al., 2020) |

(Continua)

| Mn (µg g⁻¹) | Mo (µg g⁻¹) | Na (µg g⁻¹) | Ni (µg g⁻¹) | P (µg g⁻¹) | Localidade* | Referência |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| 118,5 ± 6,35 | - | - | ND | - | Egito | (Abou-Arab & Donia, 2000) |
| 73,3 | ND | 300 | - | 1930 | Índia | (Singh & Garg, 2006) |
| 129,66 ± 22,76 | | 1892,12 ± 279,46 | 4,74 ± 1,17 | 3266,91 ± 311,47 | Turquia | (Özcan & Akbulut, 2007) |
| - | - | - | - | - | Polônia | (Suliburska et al., 2007) |
| 164,7 | - | - | 4,04 | - | Turquia | (Karadaş & Kara, 2012) |
| 310 ± 21 | - | - | - | 2571 ± 133 | Espanha | (De La Calle et al., 2013) |
| 81,55 ± 1,33 | - | - | - | - | Iraque | (Jawad, 2016) |
| 64,8 ± 11,9 | - | - | 2,0 ± 0,01 | - | Arábia Saudita | (Seddigi et al., 2016) |
| 189,1 ± 53,22 | - | - | 4,904 ± 1,618 | - | Iraque | (Matloob, 2016) |
| 253 ± 9 | - | 777 ± 25 | 0,271 ± 0,051 | - | Bangladesh | (Rahman et al., 2018) |
| 52,62 ± 4,44 | 1,71 ± 1,74 | - | 6,23 ± 1,07 | - | Paquistão | |
| 41,76 ± 6,44 | 1,23 ± 1,51 | - | 4,69 ± 1,01 | - | Índia | (R. Ahmad et al., 2019) |
| 99,89 ± 4,02 | 0,85 ± 0,53 | - | 35,92 ± 1,0 | - | Vietnã | |
| 307 ± 60,5 | - | 256 ± 83,3 | 0,417 ± 0,08 | - | Tunísia | (Potorti et al., 2020) |
| Pb (µg g⁻¹) | Sr (µg g⁻¹) | V (µg g⁻¹) | Zn (µg g⁻¹) | | Localidade* | Referência |
| 1,1 ± 0,6 | - | - | 35 ± 3,2 | | Egito | (Abou-Arab & Donia, 2000) |
| - | 51,8 | - | 37,1 | | Índia | (Singh & Garg, 2006) |
| 0,88 ± 0,14 | 12,17 ± 2,64 | 6,28 ± 1,37 | 9,25 ± 0,87 | | Turquia | (Özcan & Akbulut, 2007) |
| 0,32 | - | - | 7,15 | | Polônia | (Suliburska et al., 2007) |
| - | 19,49 | - | 22 | | Turquia | (Karadaş & Kara, 2012) |
| - | - | - | 15 ± 5 | | Espanha | (De La Calle et al., 2013) |
| 5,97±1,09 | - | - | 9,99 ± 6,21 | | Iraque | (Jawad, 2016) |
| ND | - | - | 7,5 ± 0,6 | | Arábia Saudita | (Seddigi et al., 2016) |
| 0,317 ± 0,157 | - | - | 9,06 ± 0,89 | | Iraque | (Matloob, 2016) |
| 0,602 ± 0,143 | - | 2,59 ± 0,18 | 13,8 ± 1,7 | | Bangladesh | (Rahman et al., 2018) |
| 3,25 ± 0,59 | 12,73 ± 1,73 | - | - | | Paquistão | |
| 2,72 ± 0,99 | 12,85 ± 9,39 | - | - | | Índia | (R. Ahmad et al., 2019) |
| 5,15 ± 2,26 | 20,61 ± 3,65 | - | - | | Vietnã | |
| 0,0631 ± 0,0085 | - | - | 16,1 ± 3,3 | | Tunísia | (Potorti et al., 2020) |

ND: não detectado/ *Local da obtenção das amostras, não necessariamente produzidas na mesma localidade.

CAPÍTULO 2: ÁREA DE ESTUDO

Para a realização deste estudo, foram coletadas 48 amostras de pimenta-do-reino em grãos de produtores de pimenta-do-reino da região norte do Espírito Santo após o processo de secagem. As amostras de pimenta-do-reino foram secas de acordo com o procedimento de cada produtor e coletadas em quatro campanhas, a primeira (C1) foi realizada em julho de 2017, a segunda (C2) em novembro de 2017, a terceira (C3) em fevereiro de 2018 e a quarta (C4) em julho de 2018. As campanhas de coleta C1 e C4 foram realizadas no período seco (S) e as campanhas de coleta C2 e C3 foram realizadas no período chuvoso (C) com os seguintes parâmetros ambientais: precipitação média (S, 44 mm; C, 139 mm), temperatura (S, 21 °C; C, 25 °C), radiação solar (S, 1189 KJ/m²; C, 1301 KJ/m²) e umidade relativa (S, 87%; C, 86%).

Os produtores de pimenta-do-reino foram identificados de acordo com método de secagem utilizado. Os quatro métodos de secagem escolhidos foram: Natural em Terreiro (NT), Natural em Estufa (NE), Mecânica com Fogo Direto (MFD) e Mecânica com Fogo Indireto (MFI). Foram selecionadas três propriedades para cada tipo de secagem, sendo que dois produtores apresentam dois diferentes métodos de secagem, com isso totalizando 10 propriedades produtoras de pimenta-do-reino. Na Tabela 4 apresenta as coordenadas geográficas de cada produtor com os respectivos códigos das amostras. E na Figura 13 encontra-se a localização dos produtores. As amostras foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em temperatura ambiente. E antes de cada análise, todas as amostras foram preparadas de acordo com o método utilizado.

Tabela 4. Coordenadas Geográficas, tipo de secagem de cada produtor de pimenta-do-reino e código das amostras.

| Produtores | Coordenadas Geográficas | Código |
|-------------------|--------------------------------|---------------|
| P1 | 18°40.006' S;40°15.312' W | NT1 |
| P2 | 18°43.652' S;40°14.374' W | NT2 |
| P3 | 18°43.203' S;40°08.342' W | NT3 |
| P4 | 18°42.039' S;40°02.117' W | NE1 e MFI3 |
| P5 | 18°40.331' S;40°03.769' W | NE2 |
| P6 | 18°43.348' S;40°13.376' W | NE3 |
| P7 | 18°48.077' S;40°17.163' W | MFD1 e MFI1 |
| P8 | 18°48.185' S;39°57.790' W | MFD2 |
| P9 | 18°43.094' S;40°08.169' W | MFD3 |
| P10 | 18°41.031' S;40°03.819' W | MFI2 |

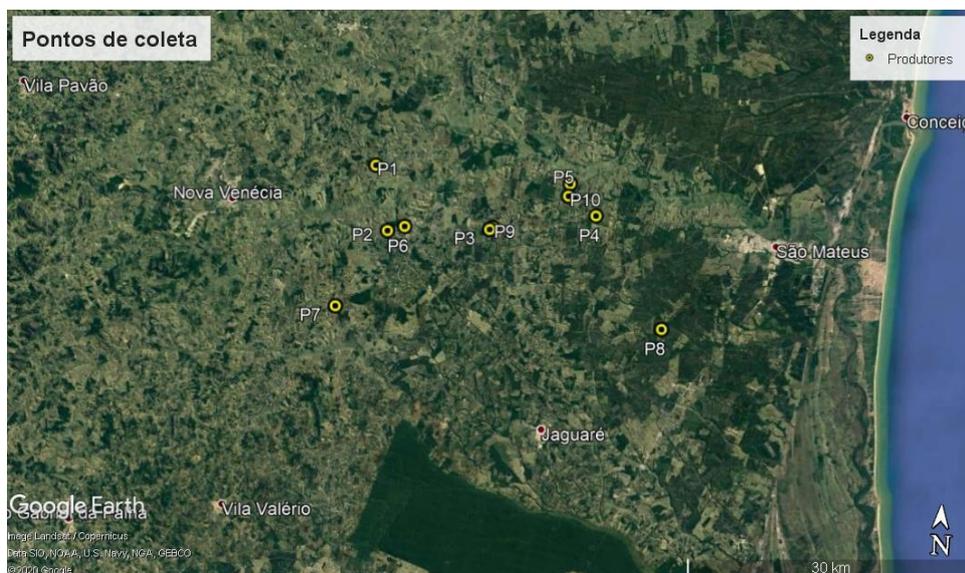


Figura 13. Localização dos produtores de pimenta-do-reino.

Também foram obtidas, diretamente de estabelecimentos comerciais amostras de pimenta-do-reino de diferentes países, a saber: Equador (em grãos), Vietnã (em grãos), Malásia (em grãos), Indonésia (em grãos), Índia (em grãos) e Sri Lanka (moída), como forma de comparação com as amostras coletadas nos produtores do ES. Os rótulos de cada amostra garantem o cultivo da pimenta-do-reino nas regiões acima mencionadas. As amostras foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em temperatura ambiente.

CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIPERINA EM PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO

3.1. OBJETIVO

3.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para determinação de piperina por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) em pimenta-do-reino e fazer a determinação nas amostras cultivadas na região norte do estado do Espírito Santo (ES), avaliando a tendência de distribuição deste composto em função do método de secagem utilizado e das campanhas de coleta e comparar com pimentas-do-reino provenientes de outras localidades.

3.1.2. Objetivos Específicos

- Otimizar o procedimento de extração sólido-líquido assistido por radiação microondas da piperina nas amostras de pimenta-do-reino.
- Otimizar as condições operacionais do HPLC-DAD para a determinação da piperina em amostras da pimenta-do-reino.
- Validar o método analítico desenvolvido por HPLC-DAD.
- Determinar o teor de piperina nas amostras de pimenta-do-reino.
- Avaliar o teor de piperina em relação ao método de secagem utilizado e da campanha de coleta realizada nas amostras do ES.
- Avaliar o teor de piperina das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades.

3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Padrões e reagentes

Para o preparo da amostra foi utilizado etanol grau HPLC (Riedel de Haen, Alemanha). Após a extração as amostras foram filtradas com um filtro Nylon Millipore® de 0,20 µm (Macherey-Nagel, Alemanha).

Nas análises cromatográficas foi utilizado acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha) e água ultrapura tipo 1+ (PURELAB Ultra Mk 2, resistividade 18,2 MΩ cm, Elga, Reino Unido).

Os padrões de calibração de piperina foram preparados em etanol grau HPLC

(Riedel de Haen, Alemanha) com diluições adequadas a partir do padrão de piperina de pureza $\geq 97\%$ (Sigma - Aldrich, USA).

3.2.2. Instrumentação

Para o preparo das amostras foi utilizado balança analítica (Sartorius, Alemanha) modelo ED224S com precisão de $\pm 0,0001\text{g}$ e banho ultrassônico (Elma, Alemanha) modelo S40H de 37KHz.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos modelo Agilent 1260 Infinity LC System (Agilent, EUA), composto por uma bomba quaternária modelo 1260 (G1311 B), termostato (G1330 B), injetor automático modelo 1260 Hip ALS (G1367 E) e um detector por arranjo de diodos (DAD) modelo 1260 VL+ (G1315 C). O equipamento foi gerenciado pelo software Chemstation versão C.01.07. Foi utilizada uma coluna de fase reversa ACE[®] 3 C18 (150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 3 μm) e temperatura de forno de 35°C.

A fase móvel foi constituída de água ultrapura tipo 1 (solvente A) e acetonitrila grau HPLC (solvente B) no modo eluição por gradiente conforme a Tabela 5. A vazão da fase móvel foi de 0,7 mL min⁻¹, o volume injetado de amostra foi de 10 μL e os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda de 260 e 343 nm.

Tabela 5. Gradiente da fase móvel do método desenvolvido para determinação de piperina em pimenta-do-reino.

| Tempo (min) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|-------------|----------------|----------------|
| 0 | 50 | 50 |
| 1 | 50 | 50 |
| 11 | 40 | 60 |
| 16 | 30 | 70 |
| 21 | 15 | 85 |
| 22 | 0 | 100 |
| 25 | 0 | 100 |

3.2.3. Preparo de amostras

Primeiramente as amostras foram trituradas usando grau e pistilo de vidro e peneiradas até obter um diâmetro menor que 0,25 mm. Para a extração da piperina, 0,500 \pm 0,005 g de pimenta-do-reino em pó foram misturados com 10 mL de etanol

grau HPLC (razão 1:20) em um vaso de vidro fechado e mantidos em banho ultrassônico por 18 min com temperatura de 50 °C, utilizando ciclo de trabalho de 80% (48 s em 12 s desligado) (Gorgani et al., 2017b; Rathod & Rathod, 2014).

Após a extração, 1 mL do sobrenadante foi então filtrado através de um filtro de Nylon Milliporede 0,20 µm e diluído 1:100 em etanol grau HPLC para posterior análise.

3.2.4. Validação Analítica

A validação do método foi realizada com base no DOC-CGRE-008, revisão 09 e a segunda edição do guia “A adequação ao objetivo dos métodos analíticos – EURACHEM” (The Fitness for Purpose of Analytical Methods – EURACHEM), por se tratar de um método não padronizado e desenvolvido pelo laboratório. A abordagem para a validação do método foi o de laboratório único, ou seja, sem a abordagem de comparação interlaboratorial, mas garantindo que o método é adequado ao uso pretendido. As características de desempenho investigadas e o quão detalhada foram essas investigações estão com base no objetivo do método desenvolvido (INMETRO, 2020; Magnusson & Örnemark, 2014).

Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão. Após a validação todas as amostras foram extraídas em duplicata e analisadas e os resultados foram reportados como média ± desvio padrão.

3.2.4.1. Seletividade

Um método é seletivo quando ele é capaz de quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos e matrizes sem interferências de outros componentes de comportamento similar (Magnusson & Örnemark, 2014). Em HPLC-DAD pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou a coeluição de interferentes com o analito de interesse. A seletividade do método foi avaliada comparando o cromatograma obtido do extrato da pimenta-do-reino e do extrato da pimenta-do-reino fortificado e foi realizada a quantificação em dois comprimentos de onda diferentes.

3.2.4.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção do método (LD) é definido como a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém, não

necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Há diferentes maneiras de estabelecer o limite de detecção de um método, uma delas é a estimativa pelo desvio padrão do branco com adição da menor concentração aceitável do analito, (INMETRO, 2016) calculado da seguinte forma:

$$LD = 0 + t_{(n-1,1-\alpha)} \times s$$

Sendo:

t: abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança;

s: desvio padrão amostral de 10 leituras do branco da amostra com adição.

Já o limite de quantificação do método (LQ) é definido como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, sendo calculado pela equação:

$$LQ = 0 + 10 \times s$$

Onde:

s: desvio padrão amostral de 10 leituras do branco da amostra com adição.

3.2.4.3. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho é o intervalo onde o método fornece resultados com uma incerteza aceitável, apresentado resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Os níveis de concentrações utilizados no método proposto foram escolhidos para cobrir toda a faixa de interesse (Tabela 6), sendo preparados com suas respectivas diluições do padrão de piperina em etanol grau HPLC.

Tabela 6. Níveis de concentração utilizados para a elaboração da curva analítica.

| Níveis | Piperina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|--------|------------------------------------|
| 1 | 4,95 |
| 2 | 9,90 |
| 3 | 19,80 |
| 4 | 29,70 |
| 5 | 39,60 |
| 6 | 49,50 |

3.2.4.4. Exatidão

A exatidão do método expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor de referência aceito como valor verdadeiro. Existem três abordagens para a determinação da exatidão do método: análise de materiais de referência certificados (MRC), comparação de resultados obtidos com outro método e estudos de recuperação. A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação em três níveis de concentração diferentes (baixa, média e alta) e com 6 replicatas em cada nível de concentração.

3.2.4.5. Precisão

A precisão é um termo geral que expressa a dispersão dos resultados obtidos entre ensaios independentes, repetidos numa mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é expressa quantitativamente na forma de desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR).

Para a validação do método da piperina em pimenta-do-reino, a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária.

3.2.4.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade expressa o grau de concordância ou dispersão dos resultados de ensaios executados sob as mesmas condições, como o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local. As repetições devem ser independentes, ou seja, incluir todas as etapas de preparo do processo de medição. É importante testar as concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho. Foram utilizados 3 níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho e 6 repetições para cada nível de

concentração.

3.2.4.5.2. Precisão Intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas em condições variadas, tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. O método para avaliação segue as mesmas recomendações para a repetibilidade, sendo expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV). Esse parâmetro foi avaliado analisando amostras em 3 níveis de concentração ao longo da faixa de trabalho e 5 repetições para cada nível de concentração em três dias diferentes

3.2.4.6. Incerteza de medição

O cálculo de incerteza de medição foi realizado de acordo com o Guia EURACHEM/CITAC - Determinando a Incerteza na Medição Analítica.

3.2.5. Análise estatística

Foi realizado um teste ANOVA com *post-hoc* Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias do teor de piperina entre cada tipo de secagem, campanha de coleta e entre as diferentes localidades.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Validação Analítica

3.3.1.1. Seletividade

A Figura 14 apresenta o cromatograma obtido do extrato da pimenta-do-reino e do extrato da pimenta-do-reino fortificado, onde o tempo de retenção da piperina é de 8,67 minutos e comparando o espectro ultravioleta (UV) do padrão de piperina com o pico correspondente obtido na análise do extrato da amostra (Figura 15). Assim, pode-se observar que nas condições otimizadas, o tempo de retenção de 8,67 minutos apenas o analito está presente.

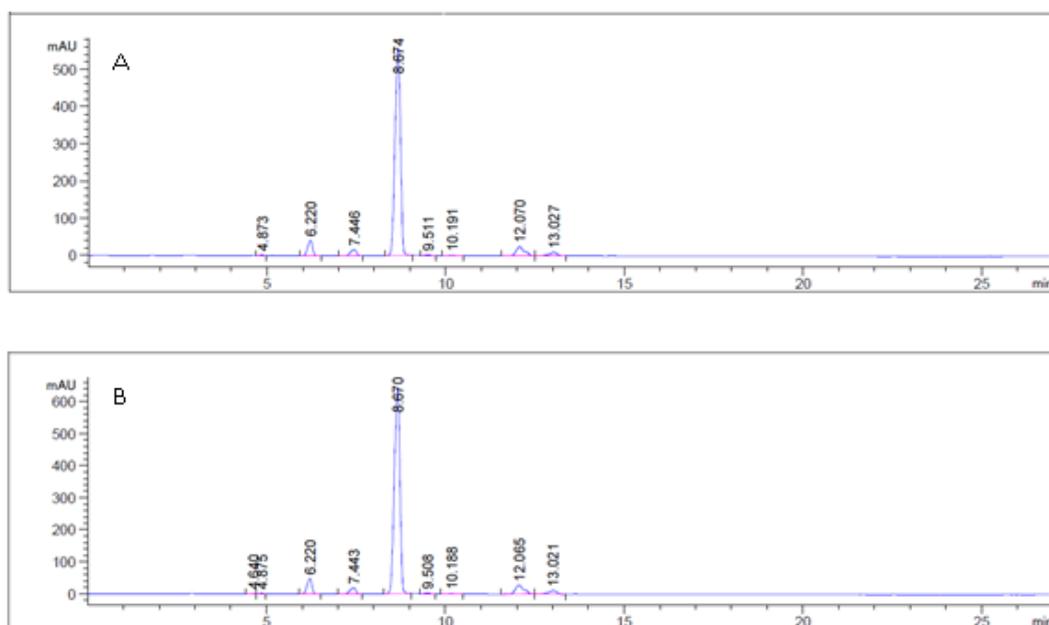


Figura 14. Cromatogramas obtidos em 343 nm pelo método desenvolvido [A] da pimenta-do-reino e [B] da pimenta-do-reino com adição de 10 µg mL⁻¹ de padrão de piperina.

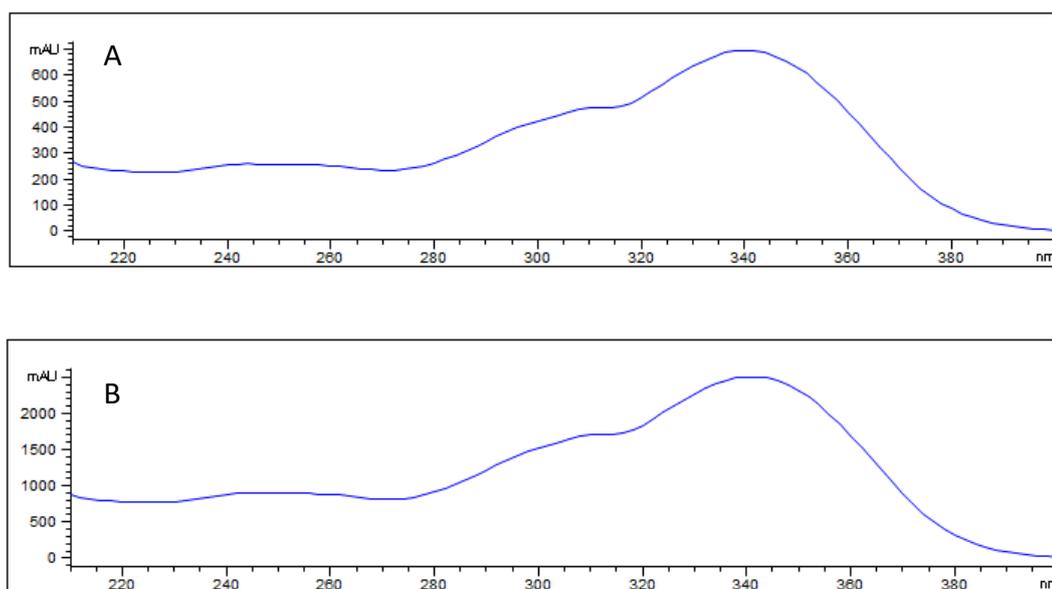


Figura 15. Espectro UV da piperina obtido [A] da amostra de pimenta-do-reino e [B] do padrão de piperina.

Outra forma de avaliar a seletividade foi quantificar as amostras em outro comprimento de onda (260 nm). Foi realizada quantificação em em 260 nm e 343 nm e os valores obtidos, apresentado na Tabela 7, foram concordantes frente ao teste t-Student ($p < 0,05$), indicando que o método cromatográfico é seletivo para a determinação de piperina em pimenta-do-reino.

Tabela 7. Concentração de piperina no extrato de pimenta-do-reino em 260 nm e 343 nm.

| Comprimento de onda | Área (mAU*s) | Piperina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|---------------------|--------------------|------------------------------------|
| 260 nm | 2362,1 \pm 37,2 | 11,74 \pm 0,19 |
| 343 nm | 6137,2 \pm 105,7 | 11,37 \pm 0,19 |

Com o objetivo de obter maior área, ou seja, maior sensibilidade e, conseqüentemente menores limites de detecção, foi escolhido o comprimento de onda 343 nm para a quantificação da piperina, como utilizado por Ahmad (2019) (R. Ahmad et al., 2019) e Wang (2017) (B. Wang et al., 2017).

3.3.1.2. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Como a piperina é o composto majoritário da pimenta-do-reino, com teor variando de 17,0 a 74,0 mg g⁻¹, não houve a necessidade de desenvolver um método com baixo nível de detecção. Assim, a adição realizada no branco da amostra foi de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na Tabela 8 estão apresentados os dados de LD e LQ calculados para o método desenvolvido e o LQ na amostra.

Tabela 8. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do método desenvolvido, o LQ na amostra em mg g⁻¹ e o limite de quantificação praticado (LQP) na amostra em mg g⁻¹.

| | LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ (mg g ⁻¹) | LQP (mg g ⁻¹) |
|----------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Piperina | 0,011 | 0,050 | 0,101 | 10,00 |

3.3.1.3. Faixa de trabalho

Após a escolha da curva de calibração (Tabela 6), para a validação do modelo foram analisadas aleatoriamente 5 replicatas independentes de cada nível da curva em ordem aleatória e, antes de calcular a equação da regressão linear, foi verificada a ausência de *outliers* para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs ($G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$). Em seguida, foi avaliada a homocedasticidade dos dados, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos pelos testes de Cochran ($C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$). Para a equação da regressão linear foi aplicado o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. A validação do modelo e a significância estatística da curva foi obtida por meio da análise de variância (ANOVA), como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Tabela de análise da variância para ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.

| Fonte | Soma Quadrática | Graus de Liberdade | Média Quadrática |
|------------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| Modelo | 2439777434 | 1 | 2439777434 |
| Residual | 1031802 | 28 | 36850 |
| Falta de Ajuste | 294957 | 4 | 73739 |
| Erro Puro | 736844 | 24 | 30701 |
| Total | 2440809237 | 29 | 84165835 |

O teste F foi aplicado para verificar a falta de ajuste do modelo desenvolvido. Para a falta de ajuste obteve-se o valor do teste $F_{\text{calc.}}$ ($MQ_{\text{faj}} / MQ_{\text{ep}}$) menor que o $F_{\text{crit.}}$, ($F_{\text{calc.}} = 2,4 < F_{\text{crit.}} = 2,78$; $p < 0,05$), indicando que o modelo está bem ajustado. O teste F também foi aplicado para avaliar a significância da regressão, obtendo o valor do teste F_{calc} ($MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{r}}$) maior que o $F_{\text{crit.}}$, ($F_{\text{calc.}} = 66208,18 > F_{\text{crit.}} = 4,20$; $p < 0,05$), indicando que a regressão é significativa. Portanto, como demonstrado, o modelo é adequado para quantificar a piperina em amostras de pimenta-do-reino.

A Figura 16 mostra a curva analítica utilizada na validação do modelo ($R^2 = 0,9996$) e o gráfico de resíduos, em função da concentração distribuído aleatoriamente (variância homogênea entre os resíduos).

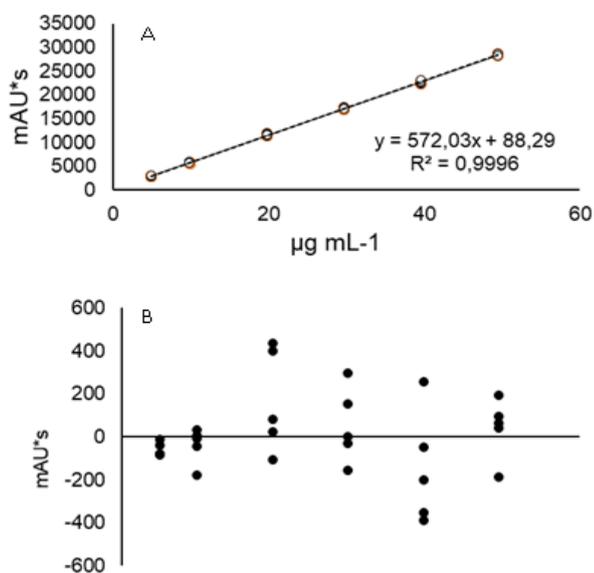


Figura 16. Curva analítica [A] para a determinação da piperina em pimenta-do-reino e gráfico de resíduos [B] em função da concentração da faixa linear de trabalho.

3.3.1.4. Exatidão

Os resultados obtidos para a avaliação da exatidão estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados de recuperação da piperina em porcentagem do método desenvolvido.

| Recuperação | | |
|--|--|-------|
| Conc. adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Conc. encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | % |
| 4,95 | 4,91 \pm 0,63 | 99,13 |
| 19,8 | 20,49 \pm 0,30 | 103,5 |
| 34,65 | 35,14 \pm 0,60 | 101,4 |

Os valores de recuperação encontrados se encontram dentro da faixa aceita pela Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) que é de 80-110% para os níveis de concentração em estudo (AOAC, 2016).

3.3.1.5. Precisão

3.3.1.5.1. Repetibilidade

O resultado da repetibilidade em desvio padrão relativo (%) está descrito na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados da repetibilidade do método desenvolvido na faixa baixa, média e alta.

| | Repetibilidade | | |
|--|----------------|-------------|------------|
| | Faixa Baixa | Faixa Média | Faixa Alta |
| Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 11,28 | 31,52 | 46,30 |
| DPR (%) | 3,29 | 0,88 | 1,38 |

Para a avaliação da repetibilidade deve-se avaliar a variabilidade intrínseca considerando a concentração de trabalho e as concentrações do analito da amostra. Dessa forma, foi utilizado o critério da AOAC para fins de aceitação do DPR encontrado. Assim, para a faixa de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é preconizado o valor de até 5,3% de DPR, todas as faixas em estudo foram aceitas (AOAC, 2016).

3.3.1.5.2. Precisão Intermediária

O resultado da precisão intermediária é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados da precisão intermediária do método desenvolvido na faixa baixa, média e alta.

| | Precisão Intermediária | | |
|--|------------------------|-------------|------------|
| | Faixa Baixa | Faixa Média | Faixa Alta |
| Conc. no Dia 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 11,28 | 32,72 | 46,30 |
| Conc. no Dia 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 11,92 | 32,19 | 47,03 |
| Conc. no Dia 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 11,52 | 31,97 | 46,30 |
| Conc. média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 11,57 | 32,25 | 46,55 |
| DPR (%) | 4,42 | 1,69 | 1,54 |
| p-valor | 0,154 | 0,083 | 0,207 |

Os critérios para a avaliação da precisão intermediária são os mesmos de repetibilidade, aceitando valores de até 5,3% de DPR, portanto todas as faixas foram aceitas. Foi realizado também a análise de variância (ANOVA) para avaliar se há diferença significativa entre os valores encontrados em dias diferentes, dado que $p > 0,05$ em todas as faixas, não rejeitamos a hipótese de que o efeito do fator dia seja nulo ao nível de significância de 5%, isto é, as médias obtidas entre os dias são equivalentes.

3.3.1.6. Incerteza de medição

A incerteza de medição foi obtida empregando o conceito de propagação de erro. A relação das variáveis de entrada no cálculo do mensurando é demonstrada através da Equação:

$$C = \frac{(C' \times Vf \times Vs)}{Vi \times m \times 1000}$$

Onde,

C é a concentração do analito na amostra (em mg/g),

C' é a concentração do analito encontrada na solução analisada (em $\mu\text{g/mL}$),

Vf é o volume final após a diluição da amostra (em mL),

V_s é o volume da amostra (em mL),
 m é a massa pesada da amostra (g),
 V_i é a alíquota utilizada na diluição da solução (em mL).

A representação das fontes e componentes de incerteza estão apresentadas no diagrama de Ishikawa na Figura 17. A linha horizontal central é o mensurando o qual se deseja obter a estimativa da incerteza, ou seja, a concentração da piperina em mg/g. As ramificações da linha principal são fontes e componentes que afetam a incerteza do mensurando. Informações mais detalhadas sobre os cálculos de incerteza estão disponíveis no Apêndice A.

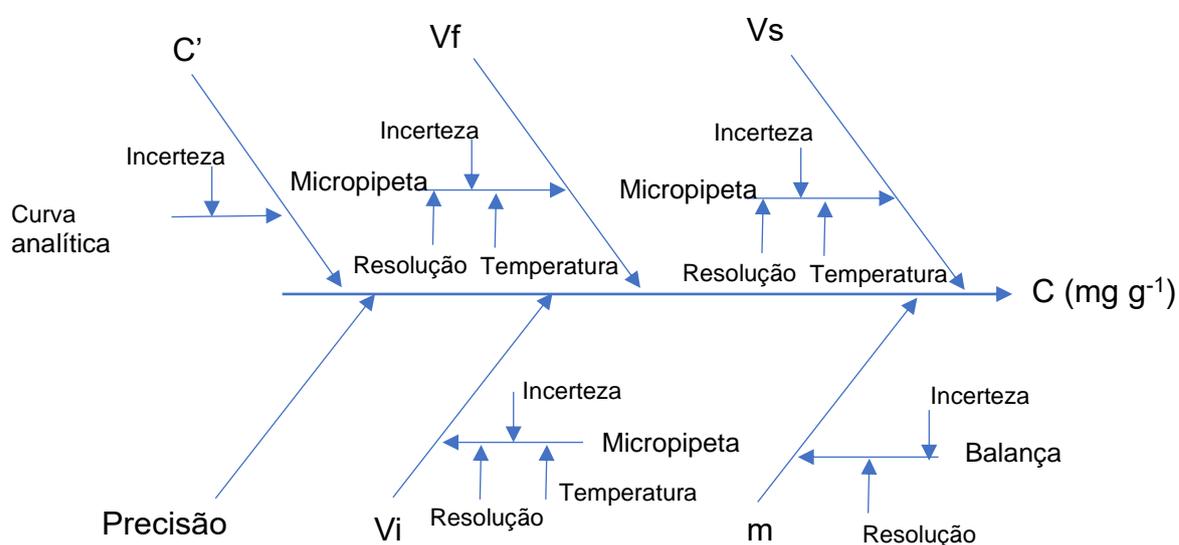


Figura 17. Diagrama de Ishikawa das fontes de incerteza associadas baseado no modelo matemático do mensurando.

Após o cálculo da incerteza de cada uma das fontes de incerteza foi obtido uma incerteza no limite de quantificação praticado de $10,00 \pm 1,13 \text{ mg g}^{-1}$, fator de abrangência (k) de 2,03 e graus de liberdade efetivo (V_{eff}) de 91.

3.3.2. Avaliação do teor de piperina em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES

Após a validação do método, o procedimento analítico foi realizado em duplicata nas 48 amostras de pimenta-do-reino coletadas. As amostras foram preparadas depois de um ano após a C4, nesse período foram armazenadas em temperatura ambiente. O teor de piperina, de todas as amostras, foi determinado e os

valores encontrados estavam na faixa de 17,65 a 35,30 mg g⁻¹ (1,76 a 3,53% m m⁻¹), valores os quais se encontram dentro do descrito na literatura que é de 1,70 a 7,40% m m⁻¹ de piperina na pimenta-do-reino (Peter, 2012). Todavia, devido ao tempo de armazenamento, pode ter ocorrido redução no teor de piperina. De acordo com Waje e colaboradores (2008), o armazenamento de pimenta-do-reino moída à temperatura ambiente por 6 meses determinou uma redução de 36% no teor de piperina (Waje et al., 2008). Contudo, os resultados obtidos para as amostras cultivadas no ES indicam, mesmo que tendo sido armazenadas por um ano, apresentaram teor de piperina dentro dos padrões.

A fim de avaliar se a campanha de coleta influenciaria no teor de piperina, já que as campanhas foram realizadas em épocas do ano diferentes, foi construído um gráfico com as concentrações médias da piperina nas quatro campanhas de coleta (Figura 18) e a comparação das médias do teor de piperina por campanha foi realizada após aplicação de ANOVA com *post-hoc* Tukey. A C2 apresentou a menor média (25,15 ± 4,20 mg g⁻¹) de concentração de piperina, porém não foi diferente de C4 (26,94 ± 4,68 mg g⁻¹). Não houve diferença entre C1, C3 e C4, sugerindo que a sazonalidade tem pouca interferência no teor de piperina nas pimentas-do-reino. Contudo, quando o teor de piperina nas amostras é avaliado para cada produtor em função das campanhas (Figura 19), é possível observar diferenças entre as campanhas de forma específica para cada produtor, isto é, não foi possível observar uma tendência central de aumento ou redução no teor de piperina em função da campanha. Logo, considera-se a hipótese que as variações entre os produtores têm maior influência no teor de piperina, sobrepondo as variações sazonais, ou seja, a forma de como cada produtor realiza o beneficiamento da pimenta-do-reino pode influenciar no teor da piperina, já que as propriedades estão na mesma região, sujeitas ao mesmo clima e intempéries. Collings e colaboradores (2018) observaram resultados semelhantes quando avaliaram o teor de piperina de pimenta-do-reino, em duas campanhas de coleta, uma no início da safra e outra no final da safra, não foram observadas diferenças na concentração de piperina nas amostras testadas (Collings et al., 2018).

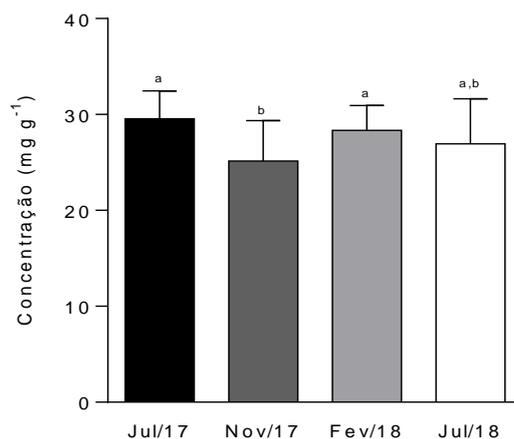


Figura 18. Concentração média (mg g⁻¹) de piperina por campanha de coleta. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à p<0,05.

Na Figura 20 estão apresentadas as concentrações médias da piperina nos quatro tipos de secagem comparadas após ANOVA e *post-hoc* Tukey. O teor de piperina não apresentou diferença entre os tipos de secagem quando utilizados os dados de todos os produtores, sugerindo que, assim como nas comparações entre campanhas, as variações entre os produtores que utilizam o mesmo tipo de secagem podem ter atenuado as diferenças entre os tipos de secagem.

Resultados semelhantes foram reportados por Wei e colaboradores (2017) que avaliaram o teor de piperina em *Piper borbonense* após diferentes processos pós-colheita (branqueamento, processo úmido e secagem) e concluíram que estes não tiveram impacto sobre a concentração de piperina (Weil et al., 2017). Por outro lado, Suresh, Manjunatha e Srinivasan (2007) avaliaram o teor de piperina em pimenta-do-reino após tratamento térmico em processos domésticos (ebulição e cozimento sob pressão) relatando redução de 16% a 34% de piperina, com perda máxima observada no cozimento sob pressão (Suresh et al., 2007). Todavia, os procedimentos foram executados em condições controladas de laboratório, o que não representa as variações de temperatura as quais as amostras deste estudo foram sujeitas. Adicionalmente, é importante ressaltar que durante o processo de secagem dos produtores, não é possível um controle rígido de temperatura, tempo de exposição, umidade, intensidade luminosa (no caso de secagem natural) e precipitações ocasionais. Estes fatores determinam a perda de piperina através de vários processos que, devido à dificuldade de controle pelos produtores, podem resultar em grandes variações nos resultados, ou seja, variações entre os produtores com o mesmo tipo

de secagem e variações entre os produtores com secagem diferentes, dificultando o controle durante o beneficiamento.

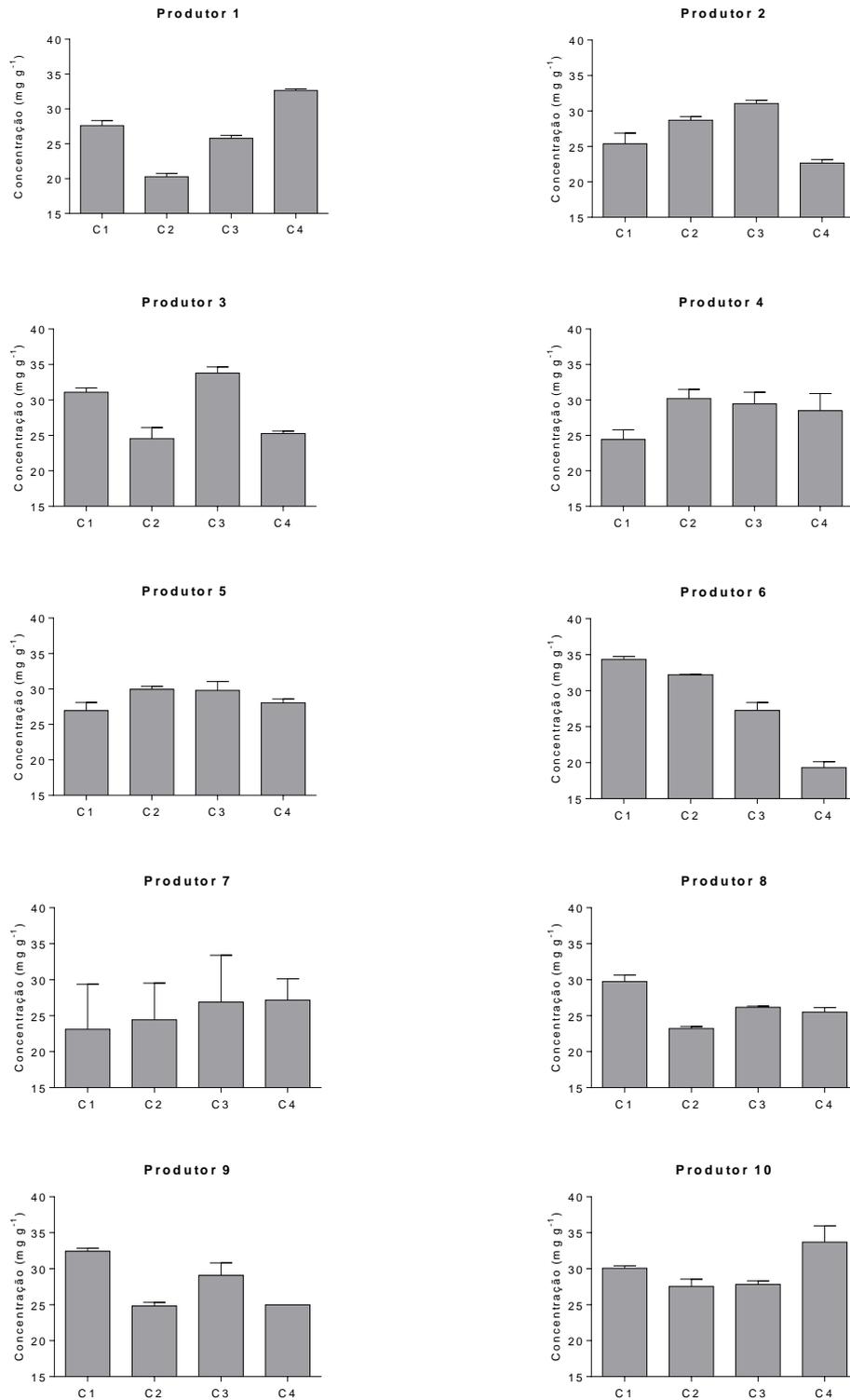


Figura 19. Concentração média (mg g⁻¹) de piperina por campanha de coleta de cada produtor.

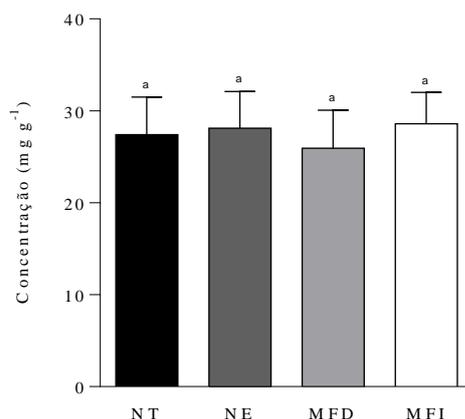


Figura 20. Concentração média (mg g⁻¹) de piperina nas amostras de pimenta-do-reino classificada por tipo de secagem. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à p<0,05.

Quando o tipo de secagem foi avaliado em cada campanha (Figura 21), não foi possível observar uma tendência. Em C1 não houve diferença no teor de piperina nas amostras submetidas aos diferentes tipos de secagem. Em C2 e C4, MFD apresentou menor concentração de piperina em relação a NE e MFI, respectivamente. Em C3, MFI apresentou menor concentração em relação à NT. Logo, destaca-se que, mais uma vez, o teor de piperina pode ser influenciado por muitos fatores, além de uma possível falta de padronização no beneficiamento da pimenta-do-reino, ou seja, mesmo com tipos de secagem iguais, a forma de manejo de cada produtor determina variações significativas, sendo maiores se comparadas as variações dos tipos de secagem.

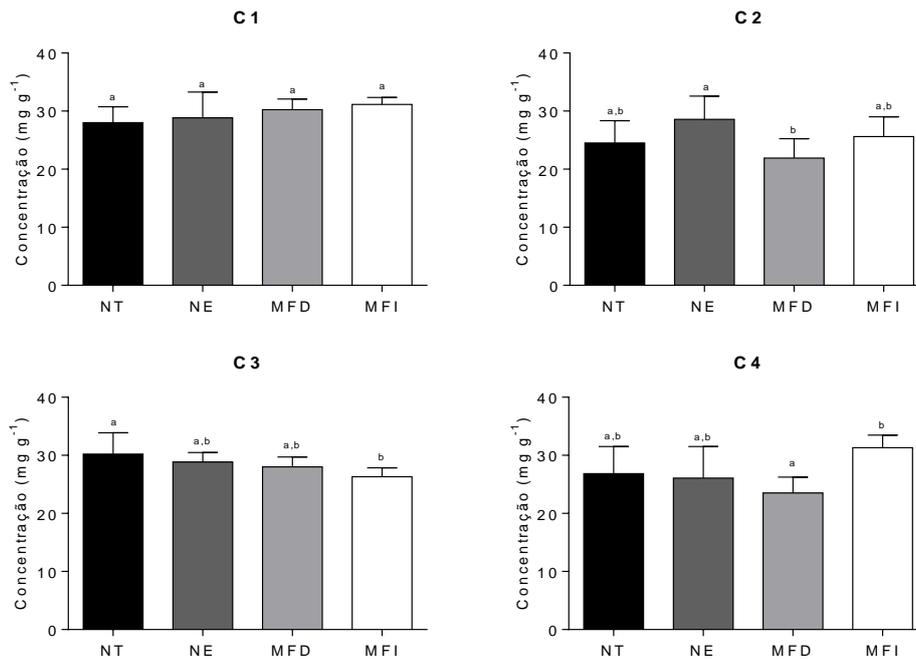


Figura 21. Concentração média (mg g^{-1}) de piperina nas amostras de pimenta-do-reino por tipo de secagem em cada campanha de coleta. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

3.3.3. Avaliação do teor de piperina em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades.

Como a piperina confere qualidade a pimenta-do-reino pela sua pungência, foi comparado o teor de piperina nas amostras do ES com amostras de diferentes localidades. Essas amostras foram obtidas diretamente de estabelecimentos comerciais, onde os rótulos de cada amostra garantem o cultivo da pimenta-do-reino nas regiões mencionadas.

O procedimento analítico otimizado foi aplicado nas oito amostras de pimenta-do-reino comerciais. A Figura 22 mostra a concentração média de piperina de cada localidade e a comparação das médias do teor de piperina por localidade foi realizada após aplicação de ANOVA com *post-hoc* Tukey. É possível observar que o teor de piperina não apresentou diferença entre os países, exceto para o Sri Lanka que apresentou o maior teor de piperina ($48,84 \text{ mg g}^{-1}$) entre as amostras avaliadas. A pimenta-do-reino do Sri Lanka é conhecida por apresentar altos teores de piperina e com isso pelo seu sabor bem marcante. Collings e colaboradores (2018) reportaram valores semelhantes ($48,59 \text{ mg g}^{-1}$) de piperina em amostra de pimenta-do-reino do Sri Lanka (Collings et al., 2018) e Rathnawathie e Buckle (1983) encontram valores

de até 49,7 mg g⁻¹ de piperina nas amostras de pimenta-do-reino do Sri Lanka dependendo do estágio de maturação do fruto (Rathnawathie & Buckle, 1983).

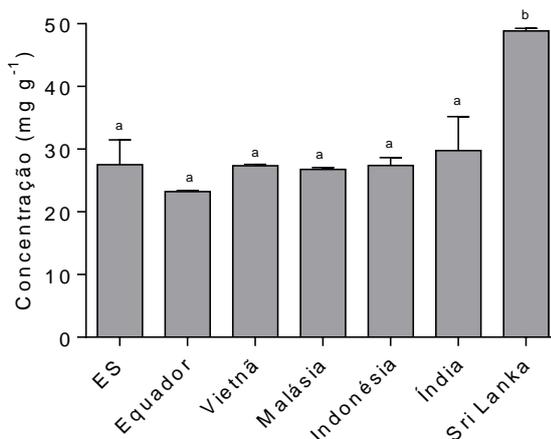


Figura 22. Concentração média (mg g⁻¹) de piperina nas amostras de diferentes localidades. Letras iguais entre colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, à p<0,05

3.4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi estabelecido um método para determinação de piperina em amostras de pimenta-do-reino por HPLC-DAD. Na etapa de validação da metodologia, a exatidão por meio do teste de recuperação variou de 99,1 a 103,5%. O coeficiente de determinação obtido demonstra excelente relação entre as áreas dos picos e as concentrações ($R^2 = 0,9996$) e o método alcançou precisão de 1,54 a 4,42%. A incerteza obtida foi $10,00 \pm 1,13$ mg g⁻¹, sendo adequado para a determinação de piperina em pimenta-do-reino.

O teor de piperina nas 48 amostras coletadas no ES em 4 campanhas de coletas, ficaram na faixa de 17,65 a 35,30 mg g⁻¹ (1,76 a 3,53% m m⁻¹) nas amostras, dentro do descrito na literatura e a sazonalidade apresentou pouca influência na variação do teor de piperina.

Ao avaliar a forma de secagem no pós-coleita, foi possível observar que não houve influência na concentração final de piperina nas amostras analisadas.

Por fim foi comparado o teor de piperina nas amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES com as amostras comercializadas em diferentes localidades, onde foi possível observar que o teor de piperina não apresentou diferença significativa entre os países, exceto para o Sri Lanka, que apresentou maior concentração.

Diante do exposto, pode-se concluir que a pimenta-do-reino produzida no ES possui uma boa qualidade em relação ao teor de piperina.

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DO PERFIL DO ÓLEO ESSENCIAL DAS PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO

4.1. OBJETIVO

4.1.1. Objetivo Geral

Identificar a composição química dos óleos essenciais de amostras de pimenta-do-reino cultivadas na região norte do estado do Espírito Santo, avaliando a tendência de distribuição destes compostos em função do método de secagem utilizado e das campanhas de coleta e comparar com pimentas-do-reino provenientes de outras localidades.

4.1.2. Objetivos Específicos

- Extrair os óleos essenciais das amostras de pimenta-do-reino empregando a técnica de hidrodestilação.
- Calcular o rendimento dos óleos essenciais obtidos.
- Identificar a composição química dos óleos essenciais através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).
- Avaliar as alterações dos compostos presentes no óleo essencial em relação ao método de secagem utilizado e da campanha de coleta realizada nas amostras do ES.
- Avaliar as alterações dos compostos presentes no óleo essencial das amostras cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades.
- Realizar um estudo estatístico utilizando a análise de componentes principais (PCA) com os compostos presentes no óleo essencial.

4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. Extração dos óleos essenciais

Primeiramente as amostras de pimenta-do-reino foram trituradas em grau e pistilo de vidro. Os óleos essenciais foram obtidos pelo método de hidrodestilação em um aparelho de Clevenger, durante 2,5 horas. Nas extrações foram utilizadas cerca de $30,0 \pm 0,5$ g de pimenta-do-reino moídas em aproximadamente 300 mL de água ultrapura tipo I (PURELAB Ultra Mk 2, resistividade 18,2 M Ω cm, Elga, Reino Unido)

em balão de fundo redondo de 500 mL. O hidrolato foi armazenado a uma temperatura menor que 0 °C para remoção da água. Após o congelamento da água, foi retirado o óleo extraído com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, transferido para um frasco âmbar e novamente estocado no freezer até a análise.

Após a remoção da água, o cálculo do rendimento foi realizado através da equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Onde:

$m_{\text{óleo}}$ = massa de óleo obtida (em gramas);

m_{amostra} = massa da amostra de pimenta-do-reino (em gramas).

4.2.2. Análise da composição dos óleos essenciais

As amostras de óleo essencial extraídas foram submetidas à análise para identificação dos seus compostos utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), modelo Trace GC 1310 acoplado a ISQ Spectrometret (Thermo Fisher Scientific) com amostrador automático: Triplus RSH (Thermo Fisher Scientific). A coluna cromatográfica utilizada é do tipo capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm) (J&W Scientific, Folsom Califórnia, USA), com temperatura de 60°C até 246°C, sendo aumentada de forma linear de 3 °C min⁻¹, permanecendo por 5 min na temperatura final. O gás de arraste utilizado foi o hélio a uma vazão constante de 1 mL min⁻¹, temperatura do injetor foi mantida em 220 °C e a temperatura da interface (GC-MS) foi mantida em 240 °C. Os óleos foram diluídos em diclorometano grau HPLC (10 mg mL⁻¹) e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor no modo split com razão 1:20. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura, realizada de 41 a 415 m/z.

4.2.3. Identificação dos componentes dos óleos essenciais

Os índices de retenção foram obtidos por meio da injeção de uma mistura de n-alcanos de cadeia linear (C₈-C₃₂) utilizando as mesmas condições nas quais foram injetados os óleos essenciais extraídos. Para o cálculo dos índices de Kovats (IK), utilizou-se os tempos de retenção dos compostos em questão e dos alcanos eluídos antes e depois do respectivo componente a ser determinado, conforme a equação abaixo:

$$IK(x) = 100P_z + 100[(\log RT_x - \log RT_{P_z}) \div (\log RT_{(P_z+1)} - \log RT_{P_z})]$$

Onde,

x = é o composto identificado

R_z = o número de átomos de carbono da mistura de n-alcanos anterior ao composto x

R_{z+1} = o número de átomos de carbono da mistura de n-alcanos posterior ao composto x

RT = o tempo de retenção

$RT(P_z) \leq RT(x) \leq RT(P_{z+1})$

A identificação dos compostos foi realizada por comparações dos espectros de massas obtidos com os da literatura (NIST 2005; Adams, 2017) e pela comparação com o IK. A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de suas respectivas bandas, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando o cromatógrafo gasoso.

4.2.4. Análise estatística

Foi realizado um teste ANOVA com *post-hoc* Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias das classes terpênicas encontradas no óleo essencial entre cada tipo de secagem e campanha de coleta. Devido ao grande número de compostos encontrados no óleo essencial, uma PCA foi aplicada para reconhecer padrões e assim identificar semelhanças entre as amostras analisadas. A matriz de dados originais \mathbf{X} ($N \times M$), apresenta N amostras e M variáveis (Wold, Esbensen, & Geladi, 1987). Antes da construção do modelo PCA, os dados foram auto-escalonados, uma vez que as variáveis que compõem a matriz \mathbf{X} apresentam ordens de diferentes magnitudes. Os cálculos foram realizados usando o software MATLAB versão 9.0 R2016a (The MathWorks Co., EUA) e o pacote computacional PCA_Toolbox versão 1.4 (Ballabio, 2015).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Extração e rendimento do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES

A hidrodestilação das amostras de pimenta-do-reino coletadas no ES resultou em 48 óleos essenciais e o rendimento das extrações variou de 0,89 a 1,44%. As extrações exaustivas, utilizando tempos maiores de destilação podem levar a extração de compostos com maiores pesos moleculares, como é o caso dos sesquiterpenos, entretanto tempos mais elevados na hidrodestilação podem ocasionar a perda de compostos menores, por degradação ou volatilização, como os monoterpenos. Como o maior rendimento do óleo essencial ocorre na primeira hora de extração, o tempo utilizando na hidrodestilação foi de 2,5h (Cannon et al., 2013; Dourado, 2012).

Bagheri e colaboradores encontram 2,16% como resultado da melhor condição de extração da cultivar Kuching (Bagheri et al., 2014b). Yu e colaboradores encontraram valor de 1,77% de rendimento de pimenta-do-reino comprada em mercado da China (Yu et al., 2017). Li e colaboradores encontraram rendimento de 0,538 – 2,079% de amostras de 5 províncias da China (Li et al., 2020). Deve-se considerar que apesar desses resultados terem sido expressos na razão da massa seca da planta em relação à massa do óleo, diferentes metodologias de extração foram utilizadas em espécies sob diferentes condições de cultivo, o que justifica as diferenças observadas. Apesar dessas variações, os rendimentos obtidos neste trabalho estão dentro do esperado.

4.3.2. Avaliação do perfil do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES

Os óleos essenciais das amostras de pimenta-do-reino foram analisados por GC-MS e as condições operacionais foram de acordo com ADAMS, 2009 e os Índices de Kovats foram calculados a partir do padrão de hidrocarbonetos lineares (C8-C32). Foram identificados ao todo 56 compostos, representando 99,23% a 99,90% total do óleo (Tabela 13). As principais classes encontradas foram os monoterpenos e os sesquiterpenos, sendo que os principais monoterpenos identificados a partir do óleo essencial de pimenta-do-reino foram o sabineno (máx. 23,13%), β -pineno (máx. 21,06%) e limoneno (máx. 22,7%) e entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno (máx. 31,7%) foi o principal. A composição encontrada foi semelhante aos descritos em

estudos pretéritos e apresenta os principais compostos odorantes da pimenta (Bagheri et al., 2014b; Jeleń & Gracka, 2015; Liu et al., 2013). De acordo com T. Jagella e W. Grosch (1999) (T & W, 1999), os principais compostos odorantes da pimenta-do-reino preta são linalol, α -felandreno, limoneno, mirceno, α -pineno, 3-metilbutanal e metilpropanal, os quais todos foram encontrados nas pimentas analisadas, com exceção de 3-metilbutanal e metilpropanal, que podem ser específicos da cultivar analisada, pois também não foram descritos em outros estudos (Bagheri et al., 2014a; Jeleń & Gracka, 2015; Jirovetz et al., 2002; Kapoor et al., 2009; Liu et al., 2013; Menon & Padmakumari, 2005; Orav et al., 2004).

Tabela 13. Identificação dos compostos dos óleos essenciais de pimenta-do-reino do ES analisados por GC-MS.

| Número dos compostos | Identificação dos Compostos ^a | Faixa da Área do Pico (%) ^b | TR ^c | IKcal ^d | IKtab ^e |
|----------------------|--|--|-----------------|--------------------|--------------------|
| Monoterpeno | | | | | |
| 1 | α -tujeno | 0,70 - 4,03 | 4,50 | 929 | 930 |
| 2 | α -pineno | 4,71 - 7,86 | 4,68 | 937 | 939 |
| 3 | Canfeno | 0,09 - 0,15 | 5,07 | 954 | 954 |
| 4 | Sabineno | 6,86 - 23,13 | 5,63 | 977 | 975 |
| 5 | β -pineno | 11,33 - 21,06 | 5,79 | 983 | 979 |
| 6 | Mirceno | 2,57 - 3,67 | 6,02 | 991 | 990 |
| 7 | α -felandreno | 0,17 - 1,00 | 6,53 | 1009 | 1002 |
| 8 | δ -3-careno | ND - 0,66 | 6,60 | 1011 | 1011 |
| 9 | α -terpineno | 0,07 - 1,76 | 6,84 | 1020 | 1017 |
| 10 | o-cimeno | 0,04 - 0,57 | 7,08 | 1028 | 1026 |
| 11 | Limoneno | 10,86 - 22,7 | 7,28 | 1034 | 1029 |
| 12 | β -felandreno | 0,11 - 2,33 | 7,32 | 1036 | 1029 |
| 13 | E- β -ocimeno | 0,11 - 0,32 | 7,76 | 1049 | 1050 |
| 14 | γ -terpineno | 0,10 - 2,76 | 8,16 | 1061 | 1059 |
| 15 | cis-sabineno hidratado | 0,10 - 1,49 | 8,58 | 1073 | 1070 |
| 16 | Terpinolene | 0,22 - 0,78 | 9,10 | 1087 | 1088 |
| 17 | Linalol | 0,23 - 1,23 | 9,66 | 1101 | 1096 |
| 18 | cis- ρ -2-mentenol | 0,02 - 0,41 | 10,54 | 1126 | 1121 |
| 19 | trans- ρ -2-mentenol | ND - 0,21 | 11,23 | 1145 | 1140 |
| 20 | Terpinen-4-ol | 0,17 - 4,32 | 12,73 | 1181 | 1177 |
| 21 | α -terpineol | 0,09 - 0,47 | 13,33 | 1195 | 1188 |
| Sesquiterpeno | | | | | |
| 22 | δ -elemeno | 0,17 - 0,59 | 19,08 | 1334 | 1338 |

| | | | | | |
|----|-----------------------------|--------------|-------|------|------|
| 23 | α -cubebeno | 0,12 - 0,28 | 19,57 | 1346 | 1351 |
| 24 | Ciclossativeno | 0,05 - 0,11 | 20,38 | 1365 | 1371 |
| 25 | α -copaeno | 1,74 - 4,04 | 20,74 | 1373 | 1376 |
| 26 | β -cubebeno | 0,12 - 0,44 | 21,25 | 1384 | 1388 |
| 27 | β -elemeno | 0,02 - 0,11 | 21,33 | 1386 | 1390 |
| 28 | α -gurjuneno | ND - 0,10 | 22,00 | 1401 | 1409 |
| 29 | β -cariofileno | 9,07 - 31,71 | 22,58 | 1417 | 1419 |
| 30 | β -copaeno | 0,11 - 0,38 | 22,91 | 1425 | 1432 |
| 31 | cis-muurolo-3,5-dieno | 0,05 - 0,19 | 23,68 | 1445 | 1450 |
| 32 | α -humuleno | 0,41 - 3,15 | 23,93 | 1451 | 1454 |
| 33 | (E)- β -farneseno | ND - 0,10 | 24,01 | 1453 | 1456 |
| 34 | (E)-cadina-1(6),4-dieno | 0,02 - 0,12 | 24,62 | 1468 | 1463 |
| 35 | 9-epi- β -cariofileno | 0,02 - 0,11 | 24,76 | 1472 | 1466 |
| 36 | trans-cadina-1(6),4-dieno | 0,11 - 0,66 | 24,96 | 1476 | 1476 |
| 37 | γ -muurolo | ND - 0,64 | 25,25 | 1483 | 1479 |
| 38 | Germacreno D | 0,02 - 0,10 | 25,37 | 1486 | 1481 |
| 39 | β -selineno | 0,12 - 0,93 | 25,56 | 1490 | 1490 |
| 40 | cis- β -guaieno | 0,16 - 0,86 | 25,73 | 1494 | 1493 |
| 41 | Isodauceno | 0,05 - 0,44 | 25,99 | 1500 | 1500 |
| 42 | β -bisaboleno | 1,13 - 4,98 | 26,17 | 1504 | 1505 |
| 43 | Cubebol | 0,18 - 2,13 | 26,36 | 1510 | 1515 |
| 44 | δ -cadineno | 0,72 - 2,96 | 26,51 | 1514 | 1523 |
| 45 | β -bisaboleno | 0,27 - 1,42 | 26,74 | 1520 | 1529 |
| 46 | trans-cadina-1,4-dieno | 0,02 - 0,12 | 27,02 | 1528 | 1534 |
| 47 | NI | 0,02 - 0,11 | 27,43 | - | |
| 48 | Elemol | ND - 0,11 | 27,67 | 1545 | 1549 |
| 49 | Germacreno B | ND - 2,28 | 27,96 | 1553 | 1561 |
| 50 | Espatulenol | ND - 0,17 | 28,7 | 1571 | 1578 |
| 51 | Óxido de cariofileno | 0,16 - 2,13 | 28,84 | 1575 | 1583 |
| 52 | NI | 0,02 - 0,26 | 30,39 | - | |
| 53 | NI | 0,04 - 0,49 | 30,68 | - | |
| 54 | Epi- α -muurolol | 0,05 - 0,19 | 31,27 | 1639 | 1642 |
| 55 | α -muurolol | 0,65 - 2,28 | 31,38 | 1642 | 1646 |
| 56 | NI | ND - 0,65 | 32,96 | - | |

^aCompostos majoritários listados na ordem de eluição utilizando coluna DB-5MS. ^bFaixa da área relativa encontrado em todos os compostos; ^cTempo de Retenção em minutos; ^dÍndice de Kovats calculado através de dados obtidos por amostra de n-alcanos saturados (C8-C32); ^eÍndice de Kovats tabelado.

Devido ao grande número de compostos presentes no óleo essencial, primeiramente foi realizada uma comparação em relação as classes terpênicas, tanto para as campanhas de coleta quanto para os tipos de secagem. Por meio da média das áreas relativas das classes terpênicas em cada campanha (Figura 23), apenas em C2 foi observada diferença, apresentando maior teor de monoterpenos e o menor teor de sesquiterpenos. Os estudos que objetivam avaliar as variações na composição do óleo essencial são restritivos em sua abordagem experimental, especialmente em relação ao controle das espécies vegetais de forma a minimizar os fatores intrínsecos. Assim, controla-se horários e forma de colheita, a cultivar, a luminosidade, a temperatura, a pluviosidade e, em geral, utilizam o mesmo indivíduo (Figueiredo et al., 2008; Morais, 2009; Zachariah et al., 2010). Neste trabalho, o objetivo foi avaliar as modificações no perfil volátil que são provenientes do processamento da pimenta-do-reino considerando que este processamento contém etapas de *blend* entre vários indivíduos com etapas de maturação distintas, isto é, grandes variações no perfil volátil poderiam ser esperadas, porém, dificilmente apresentariam diferenças frente a testes estatísticos. Todavia, quando a média relativa de classes terpênicas foram comparadas, C2 apresentou redução de sesquiterpenos e incremento de monoterpenos em relação às demais, ou seja, embora todos os fatores que determinam modificações na composição do óleo essencial não fossem controlados, ainda assim, foi possível observar essa diferença, indicando a possível prevalência de um fator sobre os demais. Como a colheita de novembro (C2) é proveniente da floração tardia (Serrano et al., 2008), sugere-se que há diferenciação fenológica entre os indivíduos podendo resultar em variação da classe terpênica. Por outro lado, uma alteração no metabolismo secundário do vegetal devido a fatores abióticos, como a variação sazonal também poderia resultar nessa diferença (Figueiredo et al., 2008). Este comportamento também poderia explicar a tendência na redução no teor de piperina observado também em C2.

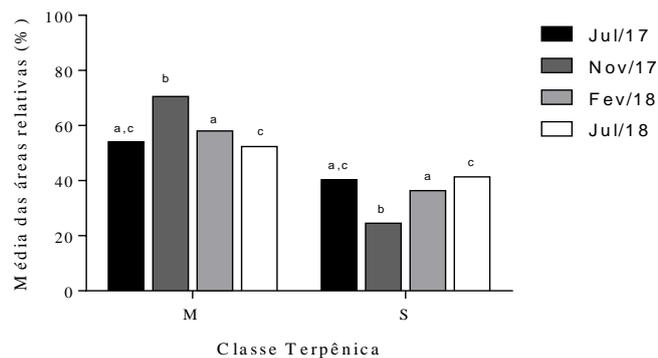


Figura 23. Média das áreas relativas das classes terpênicas: Monoterpenos (M) e Sesquiterpenos (S) em relação as campanhas de coleta. Letras iguais em barras de mesma classe terpênica não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

Na Figura 24 estão apresentadas as médias das áreas relativas das classes terpênicas, onde não foi encontrada diferença entre os tipos de secagem, entretanto foi possível observar ligeira redução (não evidenciada frente ao teste estatístico) nos sesquiterpenos e aumento nos monoterpenos para as formas mecânicas. Uma possibilidade é que devido à longa exposição às altas temperaturas, houve conversão por degradação de sesquiterpenos em monoterpenos, como também observado por An e colaboradores (An et al., 2016). Dessa forma, uma suposição válida seria que, em situações controladas de secagem conduzidas em laboratório, como observado por Guclu e colaboradores, haveria diferença estatística entre as formas mecânica e natural, entretanto durante o processamento da pimenta-do-reino, onde há uma grande variedade de fatores, não foi possível observar essa diferença (Guclu et al., 2021).

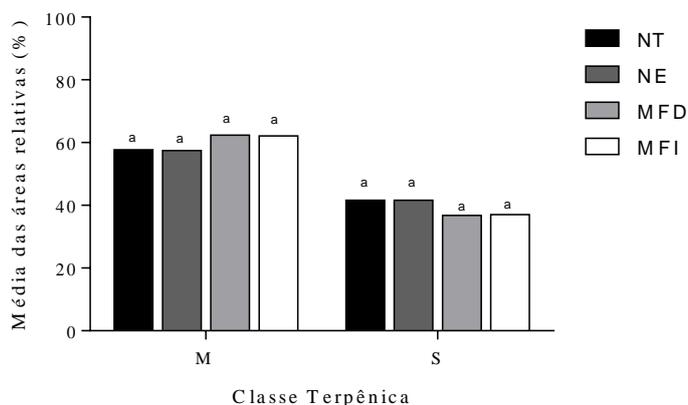


Figura 24. Média das áreas relativas das classes terpênicas: Monoterpenos (M) e Sesquiterpenos (S) em relação os tipos de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Letras iguais em barras de mesma classe terpênica não diferem entre si pelo teste de Tukey, à $p < 0,05$.

Análise por componentes principais (PCA) foi realizada para tentar identificar possíveis tendências de agrupamento relacionadas à composição do óleo, ou seja, dos compostos voláteis com os quatro tipos de secagem e as quatro campanhas de coleta. A Figura 25 corresponde ao gráfico *biplot* de *scores* e *loadings* para a primeira e a segunda componentes principais, representando respectivamente, 75,30% e 18,72% da variância explicada, totalizando 94,02% das informações dos dados. De maneira geral, o tipo de secagem da pimenta-do-reino não afetou a composição dos óleos essenciais de forma significativa, apresentando apenas uma tendência de agrupamento das secagens natural e das secagens mecânica. Os compostos que apresentaram maior peso nessa separação, entre as secagens natural e mecânica foram os sesquiterpenos α -copaeno, β -cubebeno, α -gurjuneno e Espatuleno (os números dos compostos são apresentados na Tabela 13). É possível observar na Figura 25 que as secagens naturais apresentaram maiores teores de sesquiterpenos, corroborando com o que foi observado na Figura 24.

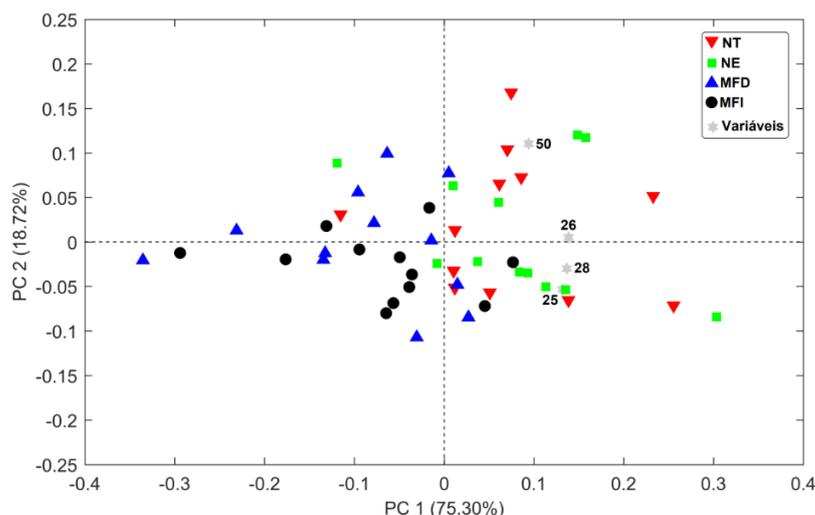


Figura 25. Análise de componentes principais: Gráfico de *scores* e *loadings* da composição do óleo essencial em relação ao tipo de secagem das amostras de pimenta-do-reino. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto.

A Figura 26 corresponde ao gráfico *biplot* de *scores* e *loadings* com três componentes principais, que juntos totalizam 74,25% das informações dos dados. É possível observar uma tendência de agrupamento em relação as campanhas de coleta. C1 e C4 foram coletadas no inverno, no mês de julho de 2017 e 2018, C2 foi realizada na primavera e C3 no verão, portanto, a composição química sofreu alterações conforme a estação do ano da coleta, além disso, é possível observar que

as variações na composição decorrentes do período da colheita se sobrepõem às variações induzidas pela secagem.

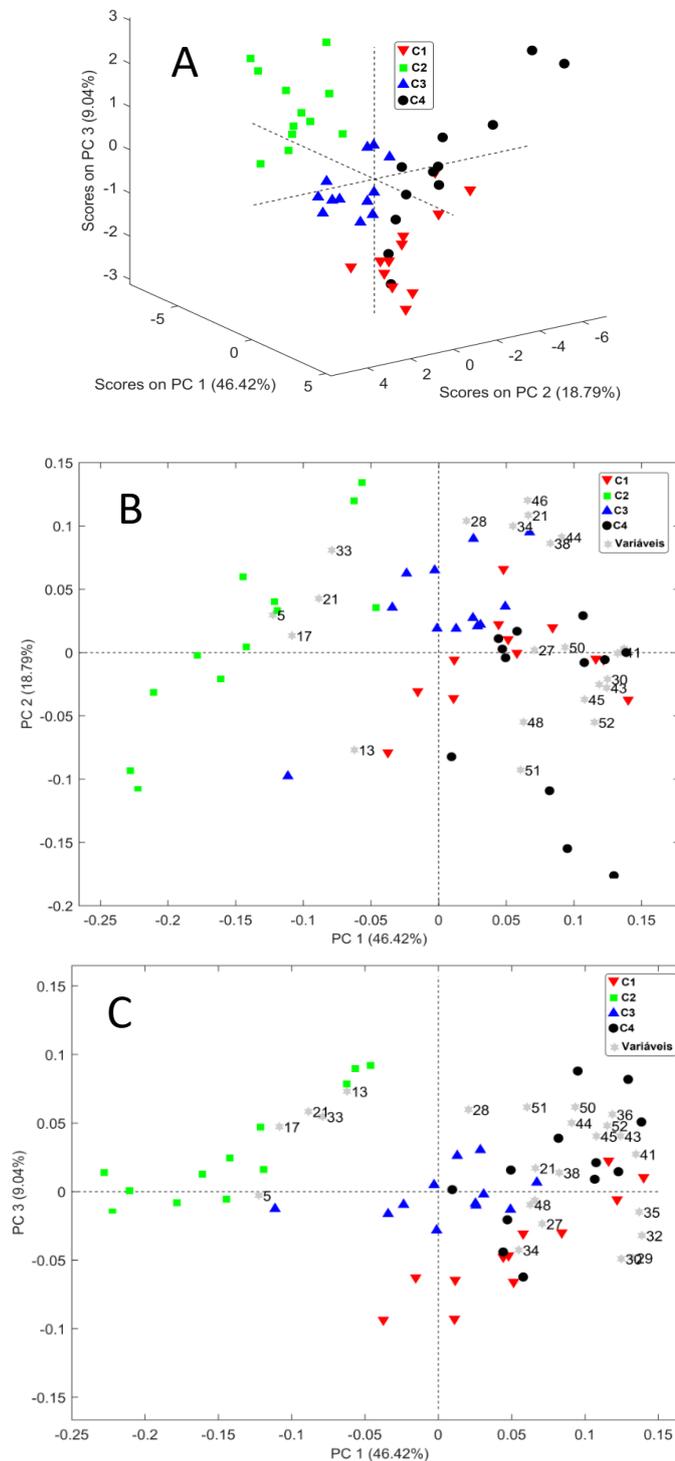


Figura 26. Análise de componentes principais: (A) Gráficos *biplot* de scores e loadings com 3 componentes principais da composição do óleo essencial em relação as campanhas de coleta (B) PC1 x PC2 (C) PC1 x PC3

4.3.3. Avaliação do perfil do óleo essencial das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades

Para avaliação do perfil dos óleos essenciais das amostras do ES comparou-se com amostras de diferentes localidades. Essas amostras foram obtidas diretamente de estabelecimentos comerciais, onde os rótulos de cada amostra garantem o cultivo da pimenta-do-reino nas regiões mencionadas.

Quando a extração dos óleos foi realizada, os rendimentos encontrados variaram de 0,89 a 1,18%. Posteriormente a análise foi realizada nas oito amostras de pimenta-do-reino comerciais. A Tabela 14 apresenta os 29 compostos principais (teor acima de 1%) encontrados nas amostras do ES e nas amostras das outras localidades. Esses compostos representam de 94% a 97% total do óleo das amostras do ES e 93 a 97% das amostras das diferentes localidades. É possível observar que diferente das amostras do ES, os principais monoterpenos identificados a partir do óleo essencial de pimenta-do-reino das diferentes localidades foram o δ -3-careno (máx. 21,32%), limoneno (máx. 23,28%) e β -felandreno (máx. 16,64%). Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno (máx. 25,75%) foi o principal, o mesmo observado nas amostras do ES.

A PCA foi realizada com os dados obtidos dos compostos majoritários (>1%) dos óleos essenciais das amostras de pimenta-do-reino do ES e das outras localidades. A Figura 27 corresponde ao gráfico *biplot* de *scores* e *loadings* com duas componentes principais, que juntas explicaram 74,32% da variância dos dados. É possível observar uma separação clara entre as amostras do ES com as demais. Os compostos que apresentaram maior peso nessa separação foram os α -tujeno, Sabineno, β -pineno e Limoneno, que apresentam os maiores teores nas amostras do ES. E α -felandreno, δ -3-careno, o-cimeno, Terpinolene e Elemol que apresentaram maiores teores nas outras amostras. Visto esses compostos monoterpenos, exceto o Elemol, sugerindo que os monoterpenos variam mais em função da origem geográfica. Essa diferença mostra que as amostras do ES apresentam características distintas, tendo assim a possibilidade de registro de Indicação Geográfica, agregando valor ao produto e promovendo o desenvolvimento da região. Isso também foi observado por Liang e colaboradores (2021) que obtiveram uma classificação das amostras de pimenta-do-reino de diferentes origens (Índia, Indonésia, Vietnã e Brasil), entretanto a

classificação utilizada foi através do espectro de massa de íons totais do GC-MS, não indicando quais os compostos qualificadores (Liang et al., 2021).

Tabela 14. Identificação dos compostos majoritários (>1%) dos óleos essenciais de pimenta-do-reino do ES e de diferentes localidades.

| Número dos compostos | Identificação dos Compostos ^a | Faixa da Área do Pico (%) ^b | | TR ^c | IKcal ^d | IKtab ^e |
|----------------------|--|--|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| | | ES | Outras localidades | | | |
| Monoterpeno | | | | | | |
| 1 | α -tujeno | 0,7 - 4,03 | 0,17 - 1,3 | 4,5 | 929 | 930 |
| 2 | α -pineno | 4,71 - 7,86 | 3,99 - 6,76 | 4,69 | 938 | 939 |
| 3 | Sabineno | 6,86 - 23,13 | 0,84 - 9,66 | 5,66 | 977 | 975 |
| 4 | β -pineno | 11,33 - 21,06 | 7,01 - 11,53 | 5,79 | 983 | 979 |
| 5 | Mirceno | 2,57 - 3,67 | 2,52 - 4,31 | 6,02 | 991 | 990 |
| 6 | α -felandreno | 0,17 - 1,0 | 0,21 - 2,24 | 6,54 | 1009 | 1002 |
| 7 | δ -3-careno | ND - 0,66 | 13,47 - 21,32 | 6,60 | 1011 | 1011 |
| 8 | α -terpineno | 0,07 - 1,76 | 0,14 - 0,51 | 6,85 | 1020 | 1017 |
| 9 | o-cimeno | 0,04 - 0,57 | 1,55 - 3,77 | 7,08 | 1028 | 1026 |
| 10 | Limoneno | 10,86 - 22,7 | ND - 23,28 | 7,27 | 1035 | 1029 |
| 11 | β -felandreno | 0,11 - 2,33 | 0,04 - 16,64 | 7,32 | 1036 | 1029 |
| 12 | γ -terpineno | 0,10 - 2,76 | 0,34 - 0,94 | 8,17 | 1061 | 1059 |
| 13 | Cis-sabineno hidratado | 0,10 - 1,49 | 0,03 - 0,38 | 8,58 | 1073 | 1070 |
| 14 | Terpinolene | 0,22 - 0,78 | 0,79 - 1,59 | 9,10 | 1087 | 1088 |
| 15 | Linalol | 0,23 - 1,23 | 0,76 - 1,54 | 9,67 | 1101 | 1096 |
| 16 | Terpinen-4-ol | 0,17 - 4,32 | 0,19 - 2,01 | 12,75 | 1182 | 1177 |
| Sesquiterpeno | | | | | | |
| 17 | δ -elemeno | 0,17 - 0,59 | 0,29 - 2,42 | 19,08 | 1334 | 1338 |
| 18 | α -copaeno | 1,75 - 4,04 | 0,88 - 2,27 | 20,73 | 1373 | 1376 |
| 19 | β -cariofileno | 9,07 - 31,71 | 12,49 - 25,75 | 22,58 | 1417 | 1419 |
| 20 | α -humuleno | 0,41 - 3,15 | 0,89 - 1,85 | 23,92 | 1451 | 1454 |
| 21 | β -bisaboleno | 1,13 - 4,99 | 0,17 - 1,78 | 26,16 | 1505 | 1505 |
| 22 | Cubebol | 0,18 - 2,13 | 0,05 - 0,24 | 26,37 | 1510 | 1515 |
| 23 | δ -cadineno | 0,72 - 2,96 | 0,33 - 0,99 | 26,51 | 1514 | 1523 |
| 24 | β -bisaboleno | 0,27 - 1,42 | 0,23 - 1,26 | 26,73 | 1520 | 1529 |
| 25 | Elemol | ND - 0,11 | 0,02 - 2,76 | 27,67 | 1545 | 1549 |
| 26 | Germacreno B | ND - 2,28 | 0,02 - 0,08 | 27,96 | 1553 | 1561 |
| 27 | Óxido de cariofileno | 0,16 - 2,13 | 0,52 - 3,59 | 28,85 | 1575 | 1583 |
| 28 | NI | 0,04 - 0,49 | 0,22 - 2,61 | 30,68 | - | |
| 29 | α -murolol | 0,65 - 2,28 | 0,10 - 0,68 | 31,39 | 1642 | 1646 |

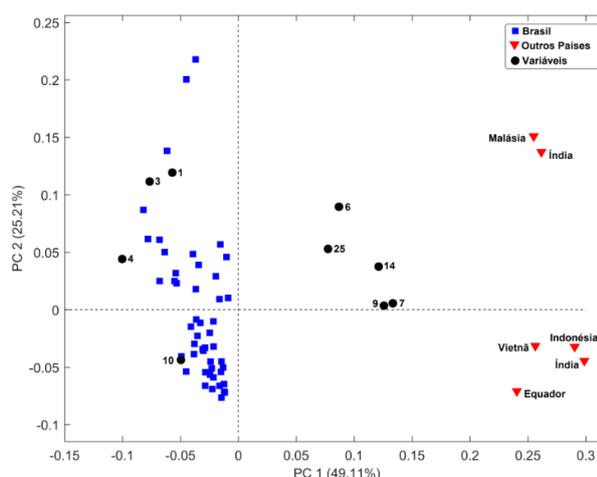


Figura 27. Análise de componentes principais: Gráfico *biplot* de *scores* e *loadings* para avaliação do óleo essencial em relação a localidade.

4.4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram obtidos óleos essenciais de amostras de pimentas-do-reino de produtores do norte do ES, nas quais foram determinados o rendimento e a sua composição. O rendimento das extrações variou de 0,89 a 1,44%. Foram identificados ao todo 56 compostos e as principais classes encontradas foram os monoterpenos e os sesquiterpenos, sendo que os principais monoterpenos identificados foram o sabineno (máx. 23,13%), β -pineno (máx. 21,06%) e limoneno (máx. 22,7%) e entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno (máx. 31,7%) foi o principal.

Na avaliação em relação à sazonalidade, foi observado que a campanha 2 (Nov/17) apresentou alterações na composição do óleo essencial inferindo que nesta campanha houve alterações no metabolismo secundário do vegetal, podendo estar relacionada ao aporte nutricional ou às variações climáticas do período de coleta.

Os tipos de secagens mecânicas (MFD e MFI) provocaram alterações na composição do óleo essencial, devido à altas temperaturas durante o processo.

Por fim foi comparado a composição do óleo essencial nas amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES com as amostras comercializadas em diferentes localidades, onde foi possível observar uma distinção clara entre elas. Isto é, as pimentas do ES apresentam características únicas quanto à composição do óleo essencial que é um dos principais componentes odorantes da pimenta-do-reino.

CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS PIMENTAS-DO-REINO CULTIVADAS NO ESPÍRITO SANTO APÓS DETERMINAÇÃO POR ICP OES E ICP-MS

5.1. OBJETIVO

5.1.1. Objetivo Geral

Determinar a composição elementar das amostras de pimenta-do-reino cultivadas na região norte do estado do Espírito Santo, avaliando a tendência de distribuição destes elementos em função do método de secagem utilizado e das campanhas de coletas e comparar com pimentas-do-reino provenientes de outras localidades.

5.1.2. Objetivos Específicos

- Realizar a decomposição assistida por radiação microondas das amostras de pimenta-do-reino para posterior determinação dos elementos químicos.
- Determinar as concentrações dos elementos Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr e Zn presentes nas amostras de pimenta-do-reino, utilizando a técnica de espectrometria emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).
- Determinar as concentrações dos elementos As, Cd, Co, Mo, Ni, Pb, e V presentes nas amostras de pimenta-do-reino, utilizando a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).
- Avaliar a tendência de distribuição destes elementos em função do método de secagem utilizado e da campanha de coleta realizada.
- Avaliar a tendência de distribuição destes elementos em função do seu local de origem.
- Fazer uma comparação dos resultados obtidos com os limites máximos estabelecidos pela legislação.
- Realizar um estudo estatístico das concentrações obtidas usando a análise por componentes principais (PCA).

5.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1. Instrumentação

Para o preparo das amostras foi utilizado estufa (Ethik Technology, Brasil) modelo 402-D e balança analítica (Sartorius, Alemanha) modelo ED224S com precisão de $\pm 0,0001$ g. Para a decomposição ácida das amostras foi utilizado forno micro-ondas (Anton Paar, Áustria) modelo Multiwave GO.

Para as análises envolvendo a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) foi utilizado o espectrômetro iCAP 6000 Series (Thermo Fisher Scientific, Inglaterra), equipado com amostrador automático, Cetac Autosampler ASX-520 (Thermo Fisher Scientific, Inglaterra) pertencente ao Laboratório Tommasi Ambiental. As condições operacionais do equipamento utilizadas na análise estão descritas na Tabela 15. Foi utilizado para a geração/manutenção do plasma, aspiração da amostra e gás auxiliar o gás argônio premier com pureza de 99,9992% fornecida pela Air Liquide (Espírito Santo, Brasil).

Tabela 15. Condições Operacionais do ICP OES.

| Condições Operacionais | |
|------------------------------|--------------------------|
| Câmara de nebulização | Ciclônica |
| Nebulizador | Concêntrico |
| Potência de radiofrequência | 1200 W |
| Fluxo de gás de plasma | 12 L min ⁻¹ |
| Fluxo de gás de nebulização | 0,5 L min ⁻¹ |
| Fluxo de gás auxiliar | 0,5 L min ⁻¹ |
| Taxa de aspiração da amostra | 0,6 mL min ⁻¹ |

Para as análises envolvendo a técnica de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi utilizado o espectrômetro (Perkin Elmer, Estados Unidos), modelo NexION™ 300D. As condições operacionais do equipamento utilizadas na análise estão descritas na Tabela 16. Foi utilizado para a geração/manutenção do plasma, aspiração da amostra e gás auxiliar o gás argônio premier com pureza de 99,9992% (White Martins Gases Industriais Ltda, Brasil).

Tabela 16. Condições Operacionais do ICP-MS NexION™ 300.

| Condições Operacionais | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Câmara de nebulização | Ciclônica de vidro com anteparo |
| Nebulizador | Concêntrico |
| Cones | Níquel |
| Potência de radiofrequência | 1500 W |
| Fluxo de gás de plasma | 16 L min ⁻¹ |
| Fluxo de gás de nebulização | 1,0 L min ⁻¹ |
| Fluxo de gás auxiliar | 1,2 L min ⁻¹ |
| Taxa de aspiração da amostra | 20 rpm |

5.2.2. Materiais e Reagentes

Todos os materiais utilizados nesse estudo passaram por um procedimento de descontaminação, sendo deixados em banho de Extran MA 02 Neutro (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 24 horas, lavados com água deionizada tipo 2 (PURELAB Option, DV 35, Elga) e deixados em banho de HNO₃ 15% v v⁻¹ por no mínimo 24 h. Após esse período, os materiais foram lavados com água ultrapura, tipo 1+ (PURELAB Ultra Mk 2, resistividade 18,2 MΩ cm, Elga, Reino Unido), secos a temperatura ambiente. A contaminação foi avaliada pelo controle do branco.

As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura tipo 1+, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% v v⁻¹ (Proquimios Comércio e Indústria Ltda, Brasil) e ácido nítrico (HNO₃) (Neon Comercial Ltda, Brasil) purificado no destilador de ácido Subboiling Distillacid BSB939 IR (Berghof, Alemanha).

Os padrões de calibração para todos os elementos foram preparados em HNO₃ a 5% v v⁻¹ com diluições adequadas de soluções estoque contendo 1000 mg L⁻¹ adquiridas da Absolute Standards Inc (Hamden, EUA). Para análise no ICP-MS foi utilizado ródio (Rh) como padrão interno preparado a partir da diluição adequada de uma solução padrão monoelementar (SpecSol, Brasil) que continha os elementos nas concentrações de 1000 mg L⁻¹.

Como não estão comercialmente disponíveis material de referência certificado com composição idêntica à da amostra em estudo, o MRC Agro C1003a – Folha de tomate foi utilizado para a verificação da exatidão dos métodos utilizados.

5.2.3. Preparo das amostras

Inicialmente as amostras foram homogeneizadas e foi realizado o

quarteamento e até que uma porção adequada para a pesagem fosse alcançada, a fim de se obter uma amostra representativa. Em seguida, as amostras foram trituradas usando grau e pistilo de vidro e passaram por um processo de secagem em estufa a 60 °C por 72 h, sendo então armazenadas em frascos plásticos descontaminados.

Para o procedimento de decomposição das amostras de pimenta-do-reino ou do material de referência certificado, pesou-se cerca de 200 mg em peso seco das amostras nos frascos específicos para o uso em forno micro-ondas, onde foram adicionados 1 mL de HNO₃ concentrado, 1 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹ e 6 mL de água ultrapura tipo 1+. Os frascos permaneceram abertos por 10 min para que fosse realizada uma pré-digestão das amostras. Em seguida, os frascos foram fechados e a mistura foi submetida a aquecimento assistido por radiação micro-ondas conforme o programa descrito na Tabela 17.

Tabela 17. Programa de aquecimento utilizado na decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas.

| Etapa | t _{rampa} (min) | T (°C) | t _{permanência} (min) |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------------------|
| 1 | 10:00 | 100 | 10:00 |
| 2 | 10:00 | 180 | 10:00 |
| Resfriamento | - | 50 | - |

Após a decomposição ácida, as amostras foram transferidas quantitativamente para tubos de polipropileno e o volume foi aferido para 15 mL. Para o preparo da curva analítica, foi utilizado padrões inorgânicos em meio de HNO₃ 5% (v v⁻¹). Os elementos determinados por ICP OES foram Al, B, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr e Zn e por ICP-MS os elementos determinados foram As, Cd, Co, Mo, Ni, Pb, e V.

5.2.4. Análise estatística

Foi realizado um teste ANOVA com *post-hoc* Tukey ($p < 0,05$) para a composição elementar na pimenta-do-reino entre cada tipo de secagem e campanha de coleta. Devido ao grande número de elementos determinados, uma PCA foi aplicada para reconhecer padrões e assim identificar semelhanças entre as amostras analisadas. A matriz de dados originais \mathbf{X} ($N \times M$), apresenta N amostras e M variáveis (Wold et al., 1987). Antes da construção do modelo PCA, os dados foram auto-escalonados, uma vez que as variáveis que compõem a matriz \mathbf{X} apresentam ordens de diferentes

magnitudes. Os cálculos foram realizados usando o software MATLAB versão 9.0 R2016a (The MathWorks Co., EUA) e o pacote computacional PCA_Toolbox versão 1.4 (Ballabio, 2015).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Características de desempenho dos métodos

Antes da determinação elementar por ICP OES e ICP-MS, foram verificadas as características de desempenho das metodologias utilizadas para assegurar a confiabilidade dos resultados. Portanto, foram feitos estudos experimentais para verificar se a linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e exatidão. Após a verificação de cada método as amostras foram analisadas.

5.3.1.1. Características de desempenho das análises por ICP OES

Na Tabela 18 são apresentados os comprimentos de onda, as faixas de trabalho utilizadas, os coeficientes angular e de determinação de cada elemento (R^2). Como pode ser observado, os valores de R^2 são superiores a 0,999, o que demonstra que todos os analitos obtiveram uma boa linearidade na faixa de concentração avaliada.

Tabela 18. Comprimento de onda, faixa de trabalho e coeficientes angulares e de determinação dos elementos determinados por ICP OES.

| Elementos | Comprimento de onda (nm) | Faixa de trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Coefficiente Angular (Cps mL μg^{-1}) | Coefficiente de Determinação (R^2) |
|-----------|--------------------------|---|---|--|
| Al | 394,401 (I) | 0,10 - 10,0 | 735,36 | 0,9996 |
| B | 249,678 (I) | 0,010 - 1,0 | 1265,7 | 0,9997 |
| Ba | 455,403 (II) | 0,0010 - 1,0 | 107695 | 0,9998 |
| Ca | 315,887 (II) | 0,10 - 10,0 | 2212,2 | 0,9999 |
| Cr | 267,716* (II) | 0,0010 - 1,0 | 38807 | 0,9998 |
| Cu | 324,754 (I) | 0,010 - 1,0 | 4325,2 | 0,9998 |
| Fe | 259,940 (II) | 0,010 - 10,0 | 3187,9 | 0,9998 |
| K | 766,490 (I) | 1,0 - 300,0 | 880,09 | 0,9998 |
| Mg | 279,079 (II) | 0,10 - 10,0 | 469,65 | 0,9998 |
| Mn | 257,610 (II) | 0,0010 - 1,0 | 18960 | 0,9999 |
| Na | 589,592 (I) | 0,10 - 10,0 | 3182,6 | 0,9999 |

| | | | | |
|----|---------------|--------------|--------|--------|
| P | 213,618* (I) | 0,10 - 10,0 | 1426,6 | 0,9999 |
| S | 182,034* (I) | 0,10 - 10,0 | 689,33 | 0,9999 |
| Si | 251,611 (II) | 0,010 - 10,0 | 819,87 | 0,9998 |
| Sr | 421,552 (II) | 0,0010 - 1,0 | 102924 | 0,9998 |
| Zn | 206,200* (II) | 0,0010 - 1,0 | 20020 | 0,9999 |

*Visão Axial

Os valores obtidos para o LD do método e para o LQ na amostra, calculados a partir do BEC estão listados a seguir (Tabela 19), apresentando valores adequados para determinação dos elementos nas amostras de pimenta-do-reino.

Tabela 19. Limites de detecção (LD) do método e limites de quantificação (LQ) na amostra dos analitos determinados por ICP OES.

| Elementos | LD do método ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | LQ na amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|------------------|--|--|
| Al | 0,018 | 4,49 |
| B | 0,0052 | 1,29 |
| Ba | 0,00019 | 0,05 |
| Ca | 0,0041 | 1,03 |
| Cr | 0,00022 | 0,05 |
| Cu | 0,0024 | 0,59 |
| Fe | 0,0014 | 0,36 |
| K | 0,029 | 7,31 |
| Mg | 0,012 | 3,12 |
| Mn | 0,00026 | 0,06 |
| Na | 0,0083 | 2,08 |
| P | 0,0014 | 0,35 |
| S | 0,0014 | 0,35 |
| Si | 0,0053 | 1,33 |
| Sr | 0,00015 | 0,04 |
| Zn | 0,000065 | 0,02 |

A exatidão do método foi avaliada através da análise do material de referência certificado (MRC) e dos testes de adição e recuperação. Os valores de concentração encontrados e os certificados para o MCR (Tabela 20) foram concordantes entre si, quando o teste de hipótese estatístico t-Student foi aplicado para um nível de confiança de 95%.

Tabela 20. Comparação entre os valores encontrados e os certificados para o MRC de folha de tomate - Agro C1003a (n = 3) dos analitos determinados por ICP OES.

| Elementos | Concentração (média ± DP µg g ⁻¹) | |
|-----------|---|------------------|
| | Valor certificado | Valor encontrado |
| Al | 1990 ± 520 | 1527 ± 37 |
| B | - | - |
| Ba | - | - |
| Ca | 27400 ± 4400 | 26543 ± 786 |
| Cr | 6,7 ± 1,5 | 5,27 ± 0,02 |
| Cu | 1130 ± 140 | 1124 ± 39 |
| Fe | 1120 ± 190 | 956 ± 43 |
| K | 43300 ± 3800 | 47080 ± 860 |
| Mg | 4110 ± 360 | 3729 ± 121 |
| Mn | 470 ± 69 | 438 ± 13 |
| Na | 2710 ± 840 | 3019 ± 106 |
| P | 4370 ± 740 | 5053 ± 127 |
| S | - | - |
| Si | - | - |
| Sr | 154 ± 49 | 149 ± 5 |
| Zn | 37,5 ± 5,0 | 35 ± 0,14 |

Para os testes de adição e recuperação (Tabela 21) durante as análises pela técnica de ICP OES, foram realizadas adições, na matriz em estudo, de diferentes concentrações (0,05, 0,50, 5,00 e 100,0 µg mL⁻¹) dependendo da faixa de concentração de cada analito, a fim de identificar possíveis perdas e/ou interferências durante as análises. As porcentagens de recuperação obtidas estão de acordo com os critérios de aceitação sugeridos pela AOAC, que é de 80-110% para adição de até 10 µg mL⁻¹ e de 90-107%, para adição até 100 µg mL⁻¹. Diante disso, pode-se inferir que os métodos propostos apresentam exatidão adequada para a determinação dos elementos nas amostras de pimenta-do-reino.

Tabela 21. Teste de adição e recuperação para avaliação da exatidão dos analitos determinados por ICP OES.

| Elementos | Teste de adição e recuperação (%) | | | |
|-----------|-----------------------------------|--------|-------|-------|
| | 0,05 | 0,50 | 5,00 | 100,0 |
| Al | - | 87,28 | 92,35 | - |
| B | 95,45 | 97,36 | - | - |
| Ba | 100,6 | 100,2 | - | - |
| Ca | - | 90,23 | 96,78 | - |
| Cr | 92,06 | 95,64 | - | - |
| Cu | 96,87 | 97,42 | - | - |
| Fe | - | 91,50 | 97,14 | - |
| K | - | - | 105,4 | 102,1 |
| Mg | - | 88,56 | 90,31 | - |
| Mn | 90,13 | 96,12 | - | - |
| Na | - | 105,8 | 101,9 | - |
| P | - | 108,7 | 104,2 | - |
| S | - | 85,28 | 91,04 | - |
| Si | - | 97,78 | 99,46 | - |
| Sr | 96,87 | 98,43 | - | - |
| Zn | 99,78 | 100,39 | - | - |

5.3.1.2. Características de desempenho das análises por ICP-MS

Na Tabela 22 são apresentados os isótopos, as faixas de trabalho utilizadas, os coeficientes angular e de determinação de cada elemento (R^2). Como pode ser observado os valores de R^2 são superiores a 0,999, o que demonstra que todos os analitos obtiveram uma boa linearidade na faixa de concentração avaliada.

Tabela 22. Faixa de trabalho, coeficientes angulares e de determinação dos elementos determinados por ICP-MS.

| Isótopos | Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Coefficiente Angular (Cps L μg^{-1}) | Coefficiente de Determinação (R^2) |
|-------------------|--|---|---|
| ^{75}As | 0,050 - 2,0 | 3119 | 0,9998 |
| ^{112}Cd | 0,050 - 2,0 | 5001 | 0,9999 |
| ^{59}Co | 0,050 - 2,0 | 32979 | 0,9998 |
| ^{98}Mo | 0,10 - 20,0 | 8151 | 1,0000 |
| ^{60}Ni | 0,10 - 20,0 | 7674 | 0,9999 |
| ^{208}Pb | 0,010 - 2,0 | 17703 | 0,9998 |
| ^{51}V | 0,050 - 2,0 | 33766 | 0,9999 |

Os valores obtidos para o LD do método e para o LQ na amostra, calculados a partir da IUPAC, estão listados a seguir (Tabela 23), tendo sido obtidos valores adequados para determinação dos elementos nas amostras de pimenta-do-reino.

Tabela 23. Limites de detecção (LD) do método e limites de quantificação (LQ) na amostra dos analitos determinados por ICP-MS.

| Isótopos | LD do método ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LQ na amostra ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|-------------------|---------------------------------------|---|
| ^{75}As | 0,00023 | 0,059 |
| ^{112}Cd | 0,000052 | 0,013 |
| ^{59}Co | 0,000056 | 0,014 |
| ^{98}Mo | 0,0042 | 1,05 |
| ^{60}Ni | 0,0017 | 0,42 |
| ^{208}Pb | 0,00016 | 0,041 |
| ^{51}V | 0,000067 | 0,017 |

A exatidão do método foi avaliada através da análise do MRC e dos testes de adição e recuperação. Os valores de concentração encontrados e os certificados para o MCR (Tabela 24) foram concordantes entre si, quando o teste de hipótese estatístico t-Student foi aplicado para um nível de confiança de 95%.

Tabela 24. Comparação entre os valores encontrados e os certificados para o MRC de folha de tomate - Agro C1003a (n = 3) dos analitos determinados por ICP-MS.

| Elementos | Concentração (média ± DP µg g ⁻¹) | |
|-------------------|---|------------------|
| | Valor certificado | Valor encontrado |
| ⁷⁵ As | 19,0 ± 2,8 | 18,59 ± 0,31 |
| ¹¹² Cd | 26,6 ± 2,1 | 24,18 ± 0,27 |
| ⁵⁹ Co | 0,33 ± 0,14 | 0,26 ± 0,01 |
| ⁹⁸ Mo | - | - |
| ⁶⁰ Ni | 3,16 ± 0,87 | 2,56 ± 0,04 |
| ²⁰⁸ Pb | 3,67 ± 0,55 | 3,62 ± 0,09 |
| ⁵¹ V | - | - |

Para os testes de adição e recuperação (Tabela 25) durante as análises no ICP-MS, foram realizadas adições de 0,5 e 1,0 µg L⁻¹, exceto para ⁹⁸Mo e ⁶⁰Ni que foram realizadas adições de 5,0 e 10,0 µg L⁻¹, contendo os analitos de interesse, na matriz em estudo a fim de identificar possíveis perdas e/ou interferências durante as análises. As porcentagens de recuperação obtidas estão de acordo com os critérios de aceitação sugeridos pela AOAC, que é de 40-120% para adição de 1 µg L⁻¹ e de 60-115%, para adição de 10 µg L⁻¹. Diante disso, pode-se inferir que os métodos propostos apresentam exatidão adequada para a determinação dos elementos nas amostras de pimenta-do-reino.

Tabela 25. Teste de adição e recuperação para avaliação da exatidão dos analitos determinados por ICP-MS.

| Elementos | Teste de adição e recuperação (%) | |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | 0,5 µg L ⁻¹ | 1,0 µg L ⁻¹ |
| ⁷⁵ As | 75,05 | 96,38 |
| ¹¹² Cd | 80,46 | 83,53 |
| ⁵⁹ Co | 91,36 | 101,30 |
| ⁹⁸ Mo* | 90,06 | 96,53 |
| ⁶⁰ Ni* | 76,65 | 98,46 |
| ²⁰⁸ Pb | 94,50 | 99,88 |
| ⁵¹ V | 87,02 | 109,64 |

*Adição realizada foi de 5,0 e 10,0 µg L⁻¹.

5.3.2. Avaliação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES

Os elementos determinados foram Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn. Sendo classificados como macronutrientes (Ca, K, Mg, P e S), micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn) e elementos não essenciais (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Na, Ni, Pb, Si, Sr e V) (Taiz & Zeiger, 2002). A concentração média e a mediana de cada elemento presente nas 48 amostras são apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26. Concentração média e mediana das amostras cultivadas no Espírito Santo.

| Elementos | Conc. (média ± DP) | Mediana |
|-----------------------------|--------------------|---------|
| Al ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 191 ± 254 | 111 |
| As ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,10 ± 0,09 | 0,073 |
| B ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 18,31 ± 4,36 | 18,27 |
| Ba ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 6,52 ± 2,98 | 5,96 |
| Ca (mg g^{-1}) | 4,57 ± 0,72 | 4,59 |
| Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,011 ± 0,008 | 0,010 |
| Co ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,064 ± 0,243 | 0,020 |
| Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,194 ± 0,375 | 0,109 |
| Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 8,55 ± 2,05 | 7,91 |
| Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 238 ± 644 | 72,9 |
| K (mg g^{-1}) | 13,95 ± 2,12 | 14,24 |
| Mg (mg g^{-1}) | 1,36 ± 0,18 | 1,37 |
| Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 63,49 ± 28,46 | 58,59 |
| Mo ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,438 ± 0,238 | 0,377 |
| Na ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 219 ± 75,1 | 204 |
| Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,604 ± 0,235 | 0,535 |
| P (mg g^{-1}) | 1,85 ± 0,280 | 1,82 |
| Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,076 ± 0,093 | 0,046 |
| S (mg g^{-1}) | 1,36 ± 0,110 | 1,38 |
| Si ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 407 ± 283 | 323 |
| Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 45,5 ± 11,7 | 45,9 |
| V ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 0,121 ± 0,120 | 0,081 |
| Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) | 12,9 ± 14,6 | 10,3 |

A Tabela 26 comparada com a Tabela 3 (Item 1.4.2) revela que em geral, as concentrações médias dos macronutrientes e micronutrientes presentes nas amostras do ES são equivalentes as das amostras comercializadas em outros países, sugerindo que esses valores são intrínsecos da pimenta-do-reino. Em relação aos elementos não essenciais, podemos destacar, Ba, Cr, Na, Pb, Cd, Co e V que apresentaram concentrações médias menores em relação aos teores encontrados em trabalhos publicados anteriormente.

Em relação aos macronutrientes, é possível observar que o K e o Ca foram os elementos que apresentaram maiores concentrações, seguido de P, S e Mg, concordando com Veloso e Muraoka (1993) que mostraram que a ordem de macronutrientes mais absorvidos pela pimenteira-do-reino e mais exportado pelos frutos é $K > Ca > Mg > S > P$ (Veloso & Muraoka, 1993). Quanto aos micronutrientes, as amostras de pimenta-do-reino apresentam maiores teores de Fe e Mn, seguidos de B, Zn e Cu e em menor quantidade, Mo. Esse resultado apresenta a composição natural esperada para esta espécie segundo Veloso e colaboradores (1998), que mostram que a ordem dos principais micronutrientes absorvidos pela pimenteira-do-reino é $Fe > Mn > Zn > B > Cu$ (VELOSO et al., 1998).

Quando se observa as médias das concentrações dos macronutrientes Ca, K, Mg e S entre as diferentes campanhas (Figura 28 e Figura 29), a campanha C2 apresentou os menores valores. Paralelamente, o micronutriente B apresentou comportamento semelhante, isto é, em C2 houve uma redução de macronutrientes (Ca, K, Mg e S) e do micronutriente B, podendo indicar mesmo que de forma indireta uma possível alteração no metabolismo secundário do vegetal. Embora, o fruto seja considerado um exportador dos nutrientes do solo, não podendo ser diretamente relacionado com a deficiência nutricional da planta, observa-se neste trabalho que em C2 houve alterações significativas no metabolismo secundário da planta. Essa alteração foi vista de forma significativa na biossíntese dos terpenos, ou seja, na composição de monoterpenos e sesquiterpenos. Como se sabe, elementos como K, Mg e Mn, atuam como cofatores enzimáticos no metabolismo secundário dos vegetais e com isso essa alteração pode provocar alteração no aroma (Ribeiro-Filho et al., 2021). Assim, verifica-se que em C2 a pimenta-do-reino sofreu alterações em suas características físico-químicas, podendo estar relacionadas de forma direta ou indireta ao menor aporte de nutrientes do solo ou a variações climáticas.

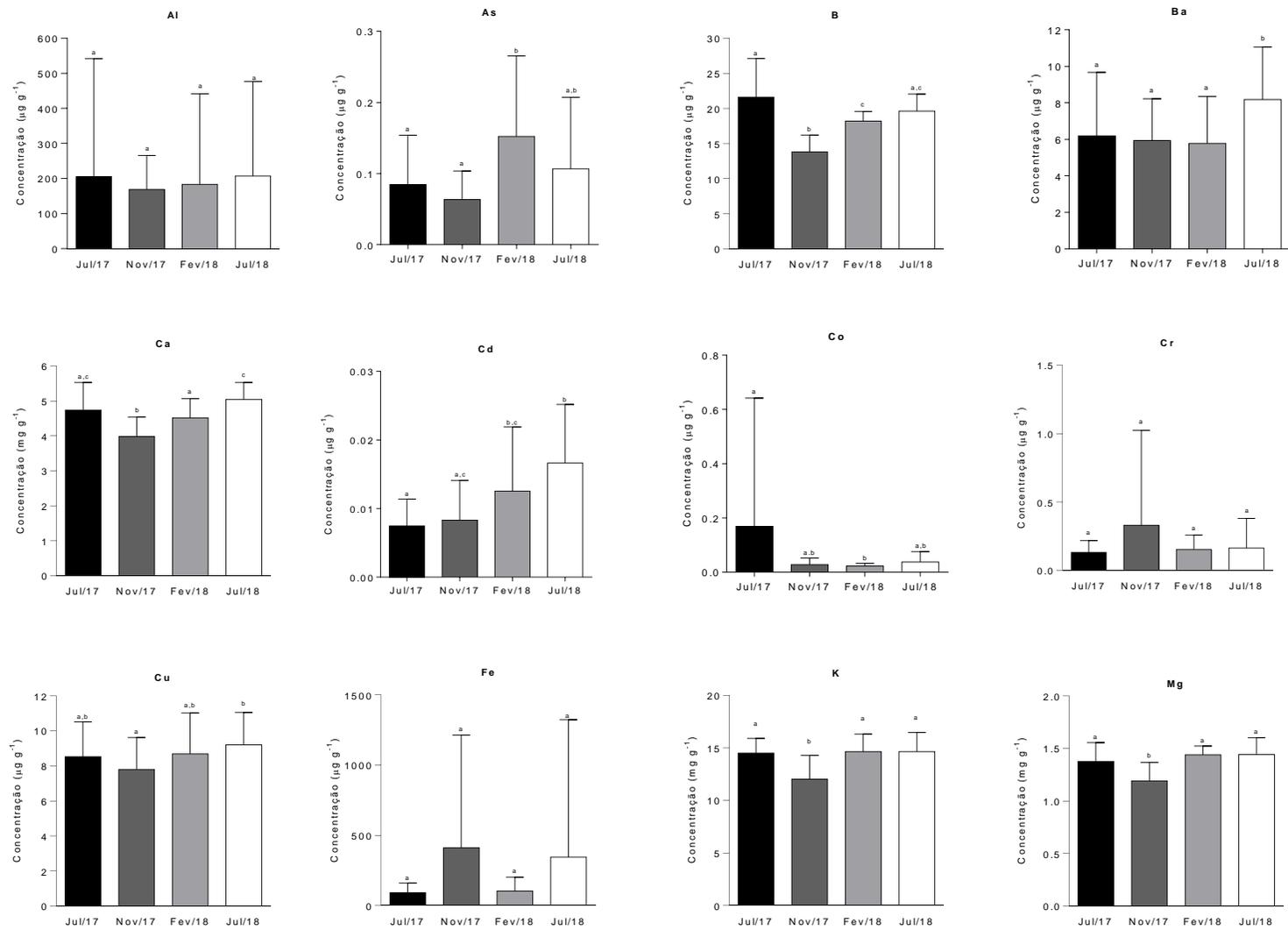


Figura 28. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por campanha de coleta. Para a,b,c $p < 0,05$.

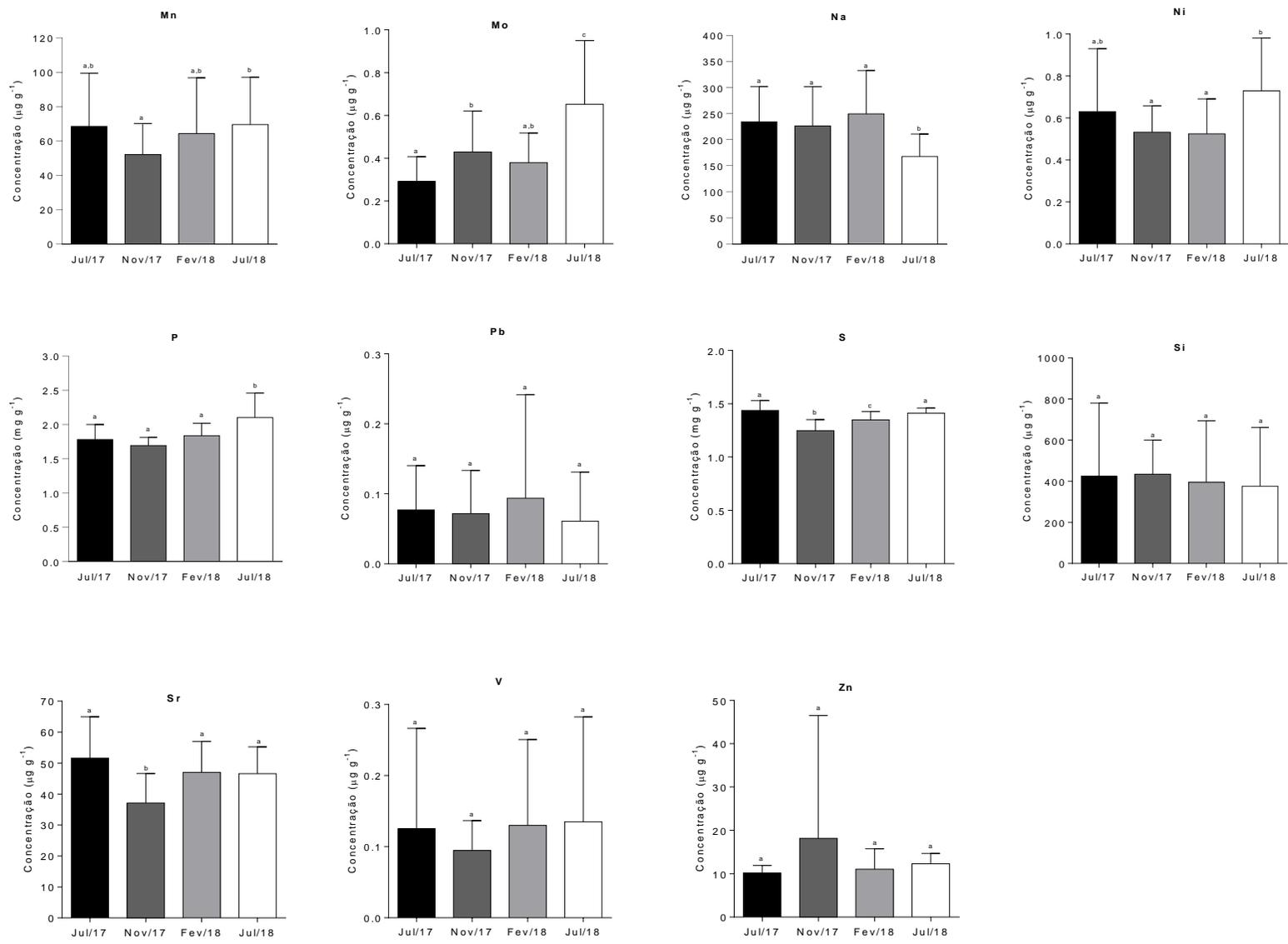


Figura 29. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por campanha de coleta. Para a,b,c $p < 0,05$.

Devido ao grande número de elementos, foi realizada uma PCA para visualizar melhor os dados obtidos. A Figura 30 apresenta o gráfico de *scores* e *loadings* com duas componentes principais, que juntos totalizam 45,58% da variabilidade total dos dados. Nela é possível observar um comportamento semelhante ao encontrado para a composição do óleo essencial em relação as campanhas de coleta, ou seja, a composição elementar apresentou também uma tendência de agrupamento em relação as campanhas de coleta: um grupo das campanhas realizadas no inverno (C1 e C4), um grupo da campanha realizada na primavera (C2) e entre elas, um grupo da campanha realizada no verão (C3). Portanto, sugere-se uma relação entre a composição elementar e a sazonalidade. Adicionalmente, C2 apresentou as menores concentrações, corroborando com os dados apresentados anteriormente que mesmo de forma indireta essa redução dos nutrientes provocou alteração do metabolismo secundário do vegetal.

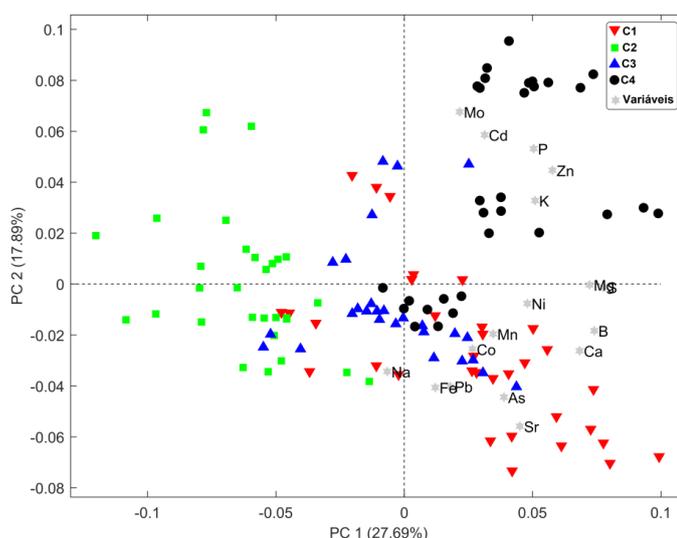


Figura 30. Análise de componentes principais: Gráfico de *scores* e *loadings* da composição elementar em relação as campanhas de coleta das amostras de pimenta-do-reino.

Em relação ao tipo de secagem, podemos destacar que Fe, Mn e Cr foram os elementos que apresentam maiores médias para MFD em relação as outras formas de secagens (Figura 32 e Figura 33). Para os demais elementos, não foram observadas diferenças significativas de forma expressiva como nos elementos Fe, Mn e Cr. Esse resultado indica que para a composição elementar, assim como no teor de piperina, as variações entre os produtores se sobrepõem as variações entre os tipos de secagem. Entretanto, as médias de Fe, Mn e Cr nas amostras secas por MFD

foram muito superiores em relação aos outros tipos de secagem, isto é, esses elementos poderiam estar sendo agregados à pimenta durante o processo, seja por atrito com os recipientes metálicos nos secadores ou através da fumaça de secagem. Em um estudo realizado anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisador do presente trabalho, Krause e colaboradores (2020), observaram que o processo de moagem mecânica da pimenta determinou o aumento de Fe, Pb e V em amostras trituradas, ou seja, estruturas metálicas podem agregar metais ao fruto por atrito (Krause et al., 2020). Todavia, no presente trabalho foram encontrados incrementos significativos de Fe, Mn e Cr que também podem ser agregados por contato com estruturas metálicas. Em outras palavras, o atrito em maior (moagem) ou menor intensidade (secagem) pode determinar transferência dos elementos que compõem a estrutura metálica para a pimenta-do-reino. Por outro lado, esperava-se que as médias em MFI também fossem superiores em relação à NT e NE, o que não foi observado. É importante salientar que as estruturas metálicas utilizadas pelos produtores que aplicam secagem do tipo MFI apresentavam estado de conservação melhor do que as dos produtores que utilizam MFD. Verificou-se que as secagens por MFD são realizadas em estruturas em avançado estado de oxidação, enquanto MFI é realizada em estruturas metálicas aparentemente mais novas e com menor estado de oxidação. (Figura 31). Estes fatores podem ser determinantes para o incremento de Fe, Mn e Cr observados em MFD.



Figura 31. Secadores dos produtores das amostras de pimenta-do-reino coletadas (A): Secagem mecânica com fogo indireto (MFI); (B): Secagem mecânica com fogo direto (MFD). Fonte: Acervo Pessoal.

Outra hipótese a ser considerada é a de que estes elementos sejam provenientes da fumaça e/ou material particulado resultante da combustão incompleta durante a etapa de secagem (Molnár et al., 2005; Ncube & Phiri, 2015). Como o contato com a fumaça não ocorre diretamente em MFI, o material particulado não entra em contato com a pimenta. Dessa forma, sugere-se que a fumaça também pode explicar o aumento de Fe, Mn e Cr encontrado em MFD.

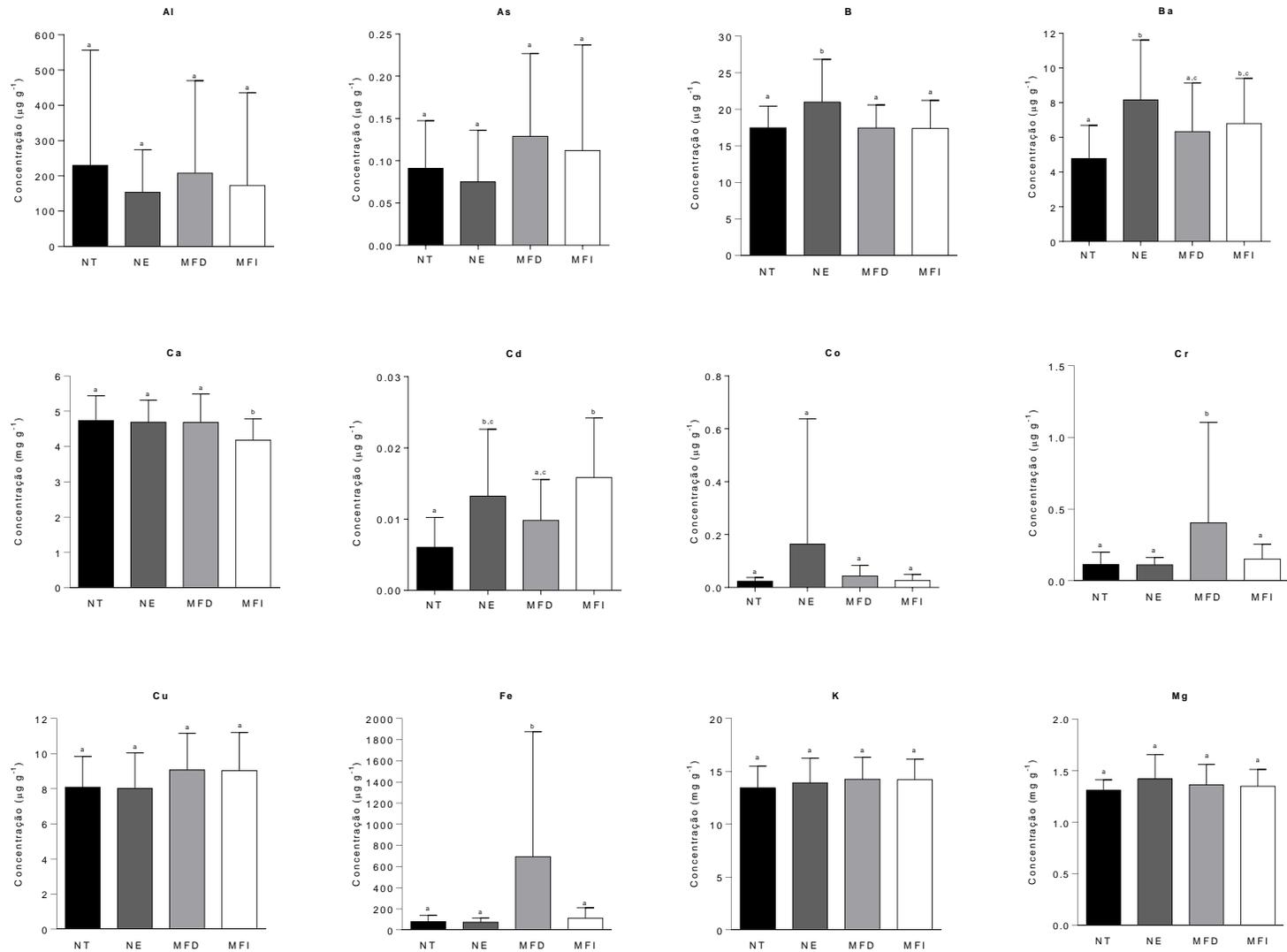


Figura 32. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por tipo de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Para a,b,c $p < 0,05$

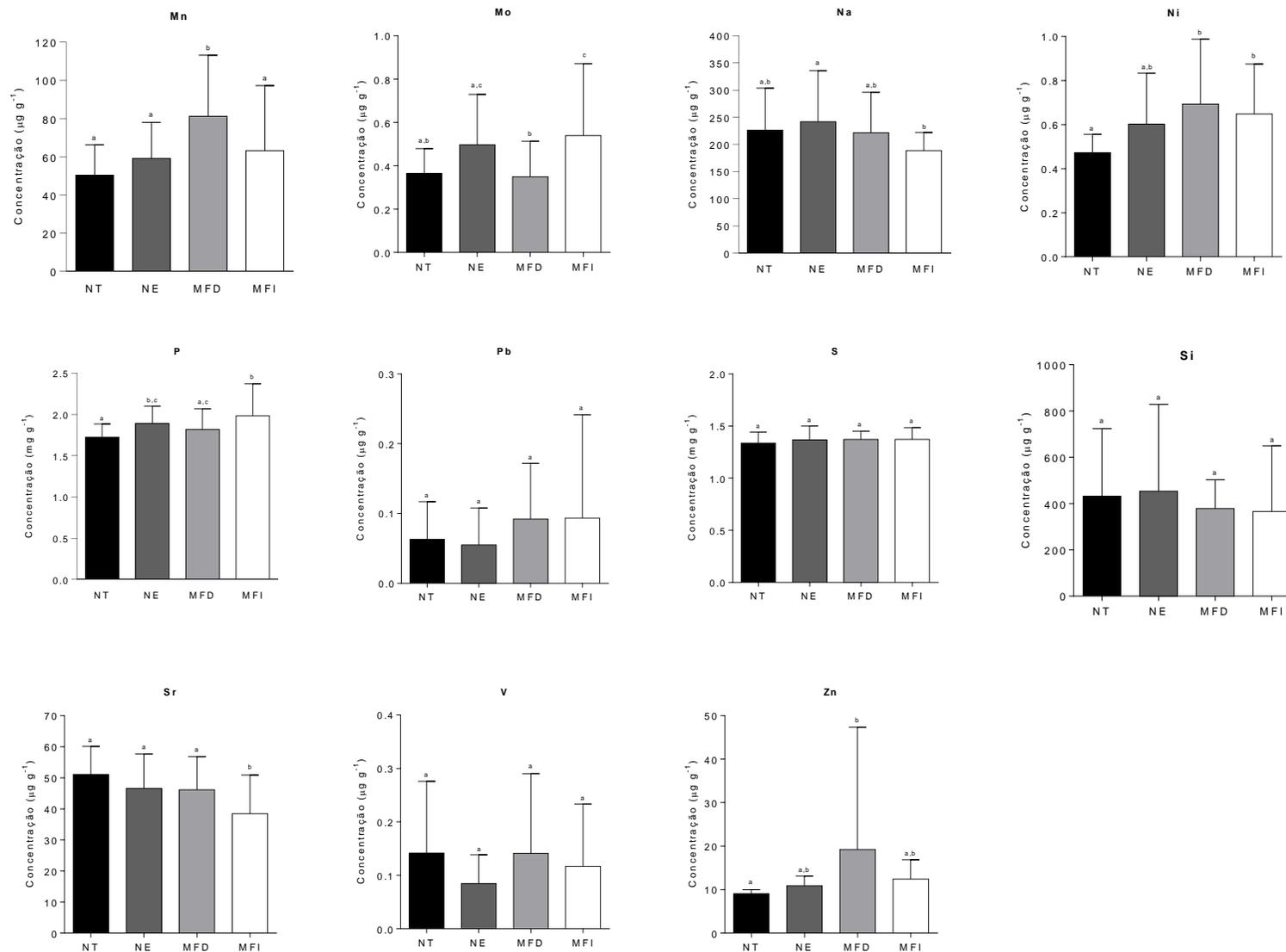


Figura 33. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por tipo de secagem. NT: Natural Terreiro, NE: Natural Estufa, MFD: Mecânica Fogo Direto e MFI: Mecânica Fogo Indireto. Para a,b,c $p < 0,05$.

Devido ao grande número de elementos e melhor interpretação dos dados, foi realizada uma PCA da composição elementar das pimentas-do-reino em relação aos tipos de secagem. O Figura 34 apresenta ao gráfico de *scores* e *loadings* com duas componentes principais, que juntos totalizam 76,99% da variabilidade total dos dados. O gráfico indica que, de modo geral, o tipo de secagem da pimenta-do-reino não afetou a composição elementar de forma significativa, como também observado no teor de piperina e a composição do óleo essencial. Ou seja, as variações provocadas ao longo do cultivo e processamento da pimenta se sobrepõem as variações provocadas apenas pela secagem.

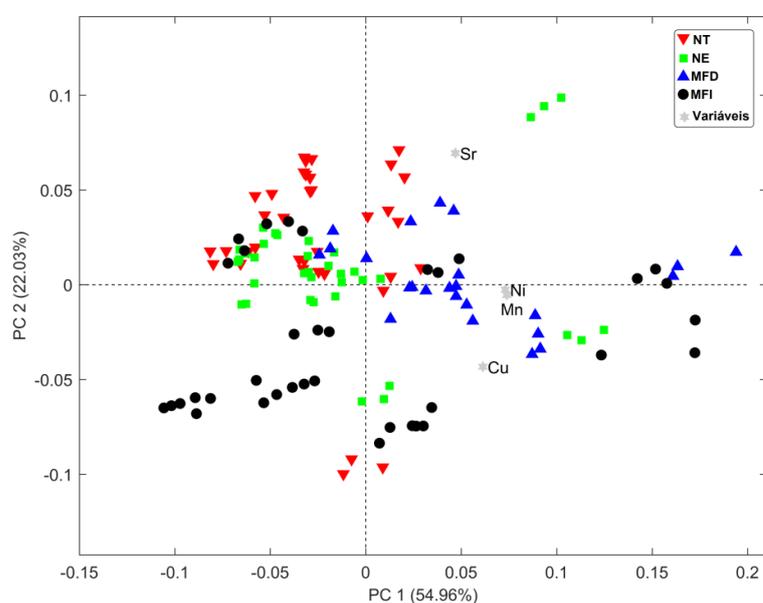


Figura 34. Análise de componentes principais: Gráfico de *scores* e *loadings* da composição elementar em relação aos tipos de secagem das amostras de pimenta-do-reino.

Existem diferentes legislações em todo o mundo que estabelecem limites máximos de vários tipos de contaminantes em alimentos. Em relação aos elementos potencialmente tóxicos, a Resolução RDC 42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos, estabelece os parâmetros de qualidade de acordo com a categoria do alimento. Como não existe uma categoria específica para a pimenta-do-reino, nesse trabalho foi adotado como referência a categoria Legumes (sementes secas das leguminosas) exceto soja. O limite máximo permitido para As, Cd e Pb é 0,10, 0,10 e 0,20 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013). Considerando estes limites, as concentrações de Cd obtidas nas amostras de

pimenta-do-reino estão em conformidade com as legislações. No entanto, foram encontrados teores de As acima do recomendado em 29% das amostras estudadas, com valor máximo encontrado de 0,46 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os teores de Pb acima do recomendado foram encontrados em 21% das amostras, com valor máximo de 0,56 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando uma possível contaminação, independente da forma de secagem ou campanha de coleta. É importante notar que as orientações utilizadas como referência não apresentam limites específicos para as especiarias, incluindo a pimenta-do-reino e, dessa forma, torna-se difícil fazer mais considerações sobre os teores encontrados nas amostras estudadas. Esse fato, evidencia a necessidade de haver uma diretriz específica para as especiarias, pois alguns estudos têm mostrado que elementos potencialmente tóxicos podem ser facilmente absorvidos pelo organismo, aumentando o risco de intoxicação desses elementos. Lin e colaboradores obtiveram um valor médio de bioacessibilidade de Pb em uma mistura de especiarias igual a 49% e Gleason e colaboradores obtiveram uma bioacessibilidade média em cúrcuma de 42,9% (Gleason et al., 2014; Lin et al., 2010). Na pimenta-do-reino, Cowell e colaboradores encontraram um valor de biodisponibilidade do Pb de 70% (Cowell et al., 2017). Já Giacomino e colaboradores encontraram concentração de As adsorvido maior do que a ingestão diária máxima admissível para este elemento em formulações ayurveda, enquanto, Hensawang e Chanpiwat que encontraram uma bioacessibilidade do As de 43,0% e 44,4% em arroz polido e descascado, respectivamente (Giacomino et al., 2015; Hensawang & Chanpiwat, 2018).

5.3.3. Avaliação da composição elementar em amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES em relação as amostras de pimenta-do-reino de diferentes localidades.

A análise de composição elementar tem sido usada de forma muito eficaz para determinar a origem geográfica de diferentes agro produtos. A composição elementar das plantas é principalmente afetada pelo solo em que são cultivadas, e elementos específicos estão intimamente relacionados à geoquímica do solo. Além do conteúdo mineral "natural" do solo e da capacidade da planta de absorver e acumular esses elementos, existem outras variáveis, como contaminação ambiental, práticas agrícolas ou no tipo de processamento do alimento, assim alterando a sua composição final (Zhao et al., 2021). Vários estudos correlacionam as plantas e seus produtos com seus ambientes originais por análise de composição elementar, no

entanto, estudos com pimenta-do-reino é escasso (Fett et al., 2020; Ocvirk et al., 2019; Ranaweera et al., 2021; Richter et al., 2019).

O mesmo procedimento de preparo e análise das amostras do ES foi realizado em triplicata nas oito amostras de pimenta-do-reino comerciais cultivadas em outras localidades. A Figura 35 e a Figura 36 mostram a concentração média dos elementos determinados nas amostras do ES e nas amostras das outras localidades e a comparação das médias das concentrações foi realizada após aplicação do teste de hipótese estatístico t-Student para um nível de confiança de 95%. Os elementos As, B, Ba, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, S, Si e Sr apresentaram diferenças significativas entre as amostras do ES e das outras localidades, indicando que esses elementos podem ser bons indicadores da rastreabilidade da origem geográfica de pimenta-do-reino. Assim como, Zhao e colaboradores que avaliaram a composição elementar de cereais, tubérculos e leguminosas e concluíram que Al, As, B, Ba, Cu, Fe, Ga, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr e Ti variam significativamente entre as diferentes regiões e que Ba e Na são marcadores adequados para identificar a proveniência geográfica se a variedade das três culturas não precisar ser considerada (Zhao et al., 2021). Fett e colaboradores utilizaram as concentrações de P, Ca, Mg, Se e As como marcadores para classificar a maconha brasileira (Fett et al., 2020). Já Muñoz-Redondo e colaboradores identificaram Cd, Se, Cs, As, Pb e Ba como os principais elementos que traçam a origem das mangas espanholas e a combinação com razões de isótopos estáveis ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{34}\text{S}$) melhorou a discriminação geográfica (Muñoz-Redondo et al., 2021).

Foi realizada uma PCA da composição elementar das amostras de pimenta-do-reino do ES e das diferentes localidades. A Figura 37 corresponde ao gráfico de *scores* e *loadings* com duas componentes principais, que juntos totalizam 70,73% da variabilidade dos dados. Os elementos B, Ba, Mg, Mn e Na foram os principais responsáveis pela classificação das amostras de pimenta-do-reino.

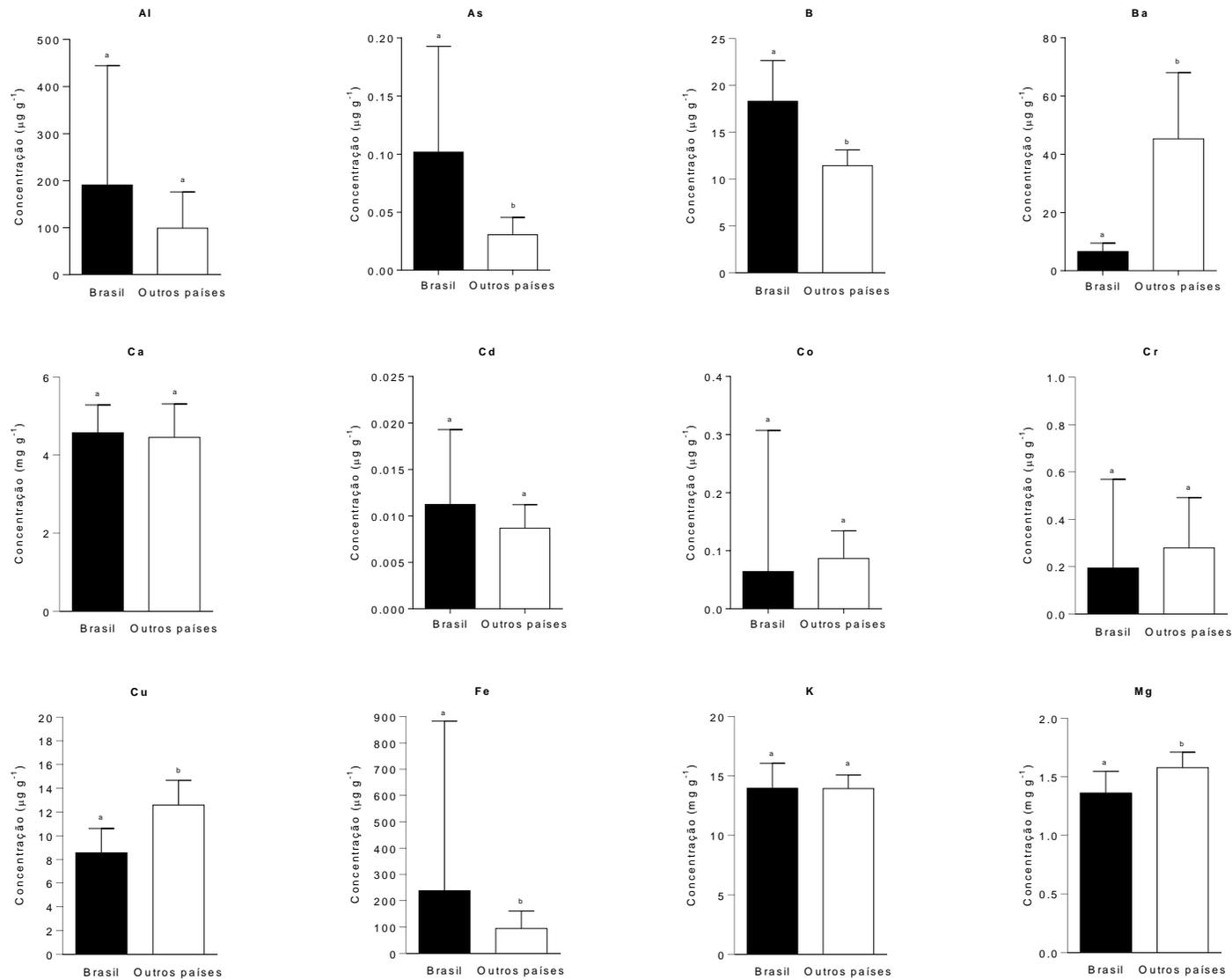


Figura 35. Concentração de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K e Mg obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por localização geográfica. Para a,b $p < 0,05$

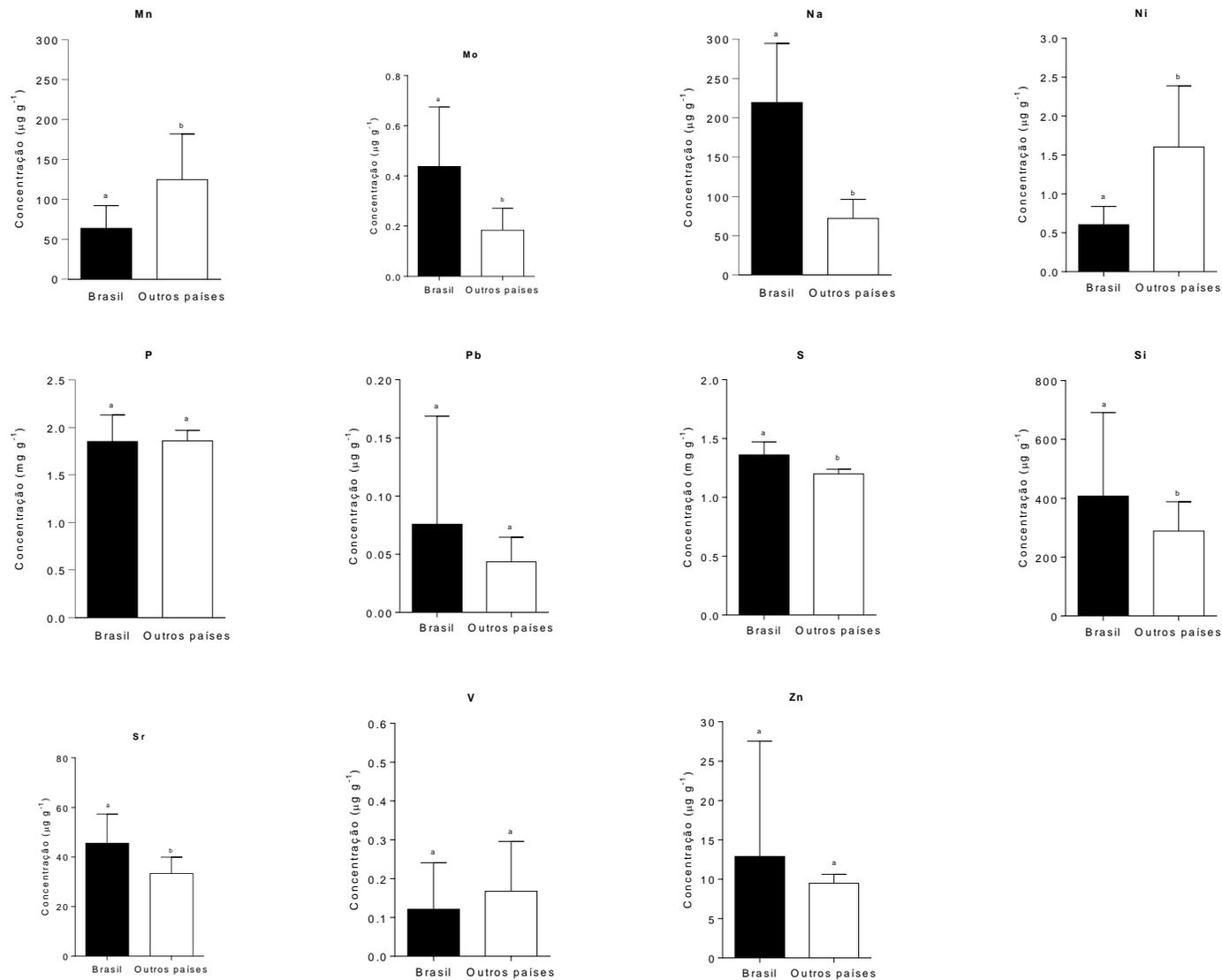


Figura 36. Concentração de Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Si, Sr, V e Zn obtidos nas amostras de pimenta-do-reino por ICP OES e ICP-MS classificada por localização geográfica. Para a,b p<0,0

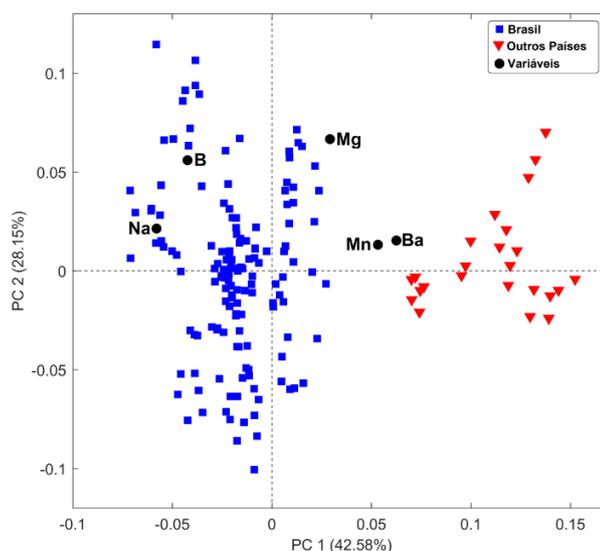


Figura 37. Análise de componentes principais: Gráfico de *scores* para avaliação da composição elementar em relação a localidade.

5.4. CONCLUSÃO

Os métodos utilizados para a determinação dos elementos nas amostras de pimenta-do-reino apresentaram boa linearidade, sensibilidade e exatidão. Foram obtidos limites de detecção e quantificação adequados para a determinação dos elementos em todas as amostras.

Em relação à sazonalidade, foi observado que a campanha C2 (Nov/17) apresentou redução de macronutrientes Ca, K, Mg e S e do micronutriente B, podendo estar relacionada ao aporte nutricional ou às variações climáticas do período de coleta.

Observou-se incremento de Fe, Mn e Cr em secagem MFD, em consequência de contato direto com estruturas metálicas e/ou com o material particulado proveniente da queima da madeira. Outro ponto importante observado é que há grande variação entre os produtores, muitas vezes se sobrepondo a fatores classificadores como tipo de secagem.

Além disso, independentemente do tipo de secagem ou campanha de coleta foi encontrado concentrações de As e Pb acima dos limites máximos estabelecidos para algumas amostras, com valores máximos encontrados de 0,46 e 0,56 mg kg⁻¹ excedendo os limites seguros para o consumo humano de acordo com a legislação brasileira.

Por fim foi comparado a composição elementar das amostras de pimenta-do-reino cultivadas no ES com as amostras comercializadas em diferentes localidades, onde foi possível observar uma distinção clara entre elas, sendo B, Ba, Mg, Mn e Na os elementos determinantes para essa distinção.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram analisadas 48 amostras de pimentas-do-reino de produtores do norte do ES para avaliar a qualidade da pimenta produzido no estado. Foram determinados o teor de piperina, a composição do óleo essencial e a composição elementar das amostras. Além disso, foram avaliados o efeito da sazonalidade e do tipo de secagem.

Pode-se concluir que a pimenta-do-reino produzida no ES possui uma boa qualidade em relação ao teor de piperina, apresentando valores semelhantes as pimentas de diferentes localidades

Em relação à sazonalidade, foi observado que na campanha de Nov/17 houve alterações na composição do óleo essencial e redução dos macronutrientes Ca, K, Mg e S e do micronutriente B. Esses resultados, indicam que nesta campanha pode ter ocorrido modificação no metabolismo secundário do vegetal, podendo estar relacionada ao aporte nutricional ou às variações climáticas do período de coleta.

Os tipos de secagens mecânicas (MFD e MFI) provocaram alterações na composição do óleo essencial, que podem estar relacionadas à exposição à altas temperaturas durante o processo. Adicionalmente, observou-se incremento de Fe e Cr em secagem MFD, em consequência de contato direto com estruturas metálicas e com o material particulado proveniente da queima da madeira. Outro ponto importante observado é que há grande variação entre os produtores, muitas vezes se sobrepondo a fatores classificadores como tipo de secagem. Todavia, foi possível evidenciar que as formas mecânicas podem determinar alterações na composição do óleo essencial e incremento de Fe e Cr.

Além disso, independentemente do tipo de secagem ou campanha de coleta foi encontrado concentrações de As e Pb acima dos limites máximos estabelecidos para algumas amostras, com valores máximos encontrados de 0,46 e 0,56 mg kg⁻¹ excedendo os limites seguros para o consumo humano de acordo com a legislação brasileira.

Por fim, esse estudo mostrou que as amostras cultivadas no ES apresentam características marcantes sendo possível autenticar a pimenta-do-reino em termos de sua origem geográfica, utilizando o perfil multielementar e a composição do óleo essencial juntamente com a análise de componentes principais.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Arab, A. A. K., & Donia, M. A. A. (2000). Heavy metals in egyptian spices and medicinal plants and the effect of processing on their levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2300–2304. <https://doi.org/10.1021/jf990508p>
- Adams, R. P. (2017). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography* /.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2013). *Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B. H., Farooq, S., Ali, M., & Khan, M. A. (2012). Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, S1945–S1953.
- Ahmad, R., Ahmad, N., & Shehzad, A. (2019). Solvent and temperature effects of accelerated solvent extraction (ASE) with Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) technique for determination of Piperine and its ICP-MS analysis. *Industrial Crops and Products*, 136, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.016>
- An, K., Zhao, D., Wang, Z., Wu, J., Xu, Y., & Xiao, G. (2016). Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food Chemistry*, 197, 1292–1300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.033>
- AOAC. (2016). Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). *Journal of AOAC International*, 1–18.
- ASTA. (2016). *GENERAL GUIDELINES FOR GOOD AGRICULTURAL PRACTICES FOR SPICES*. The American Spice Trade Association.
- Bagheri, H., Manap, M. Y. B. A., & Solati, Z. (2014a). Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta*, 121, 220–228.
- Bagheri, H., Manap, M. Y. B. A., & Solati, Z. (2014b). Response surface methodology applied to supercritical carbon dioxide extraction of Piper nigrum L. essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 149–155.
- Ballabio, D. (2015). *A MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (1.4; pp. 1–9).
- Bano, G., Raina, R. K., Zutshi, U., Bedi, K. L., Johri, R. K., & Sharma, S. C. (1991). Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*,

41(6), 615–617. <https://doi.org/10.1007/BF00314996>

- Barata, L. M., Andrade, E. H., Ramos, A. R., De Lemos, O. F., Setzer, W. N., Byler, K. G., Maia, J. G. S., & Da Silva, J. K. R. (2021). Secondary metabolic profile as a tool for distinction and characterization of cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivated in Pará State, Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms22020890>
- Betts, T. J. (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 936(1–2), 33–46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01284-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01284-5)
- Brandão, I. D. (2008). *Secador solar para produtos agroflorestais*. Embrapa Amazônia Oriental.
- Butt, M. S., Pasha, I., Sultan, M. T., Randhawa, M. A., Saeed, F., & Ahmed, W. (2013). Black Pepper and Health Claims: A Comprehensive Treatise. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9), 875–886. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.571799>
- Cannon, J. B., Cantrell, C. L., Astatkie, T., & Zheljzkov, V. D. (2013). Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.021>
- Cao, X., Ye, X., Lu, Y., Yu, Y., & Mo, W. (2009). Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. *Analytica Chimica Acta*, 640(1–2), 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.029>
- Carnevali, D. B., & Araújo, A. P. S. de. (2013). Atividade biológica da pimenta preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de literatura. *Uniciências*, 17(1), 41–46.
- Chai, L. K., & Elie, F. (2013). A rapid multi-residue method for pesticide residues determination in white and black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Control*, 32(1), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.015>
- Collings, E. R., Alamar Gavidia, M. C., Cools, K., Redfern, S., & Terry, L. A. (2018). Effect of UV-C on the physiology and biochemical profile of fresh *Piper nigrum* berries. *Postharvest Biology and Technology*, 136, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.007>
- Cowell, W., Ireland, T., Vorhees, D., & Heiger-Bernays, W. (2017). Ground turmeric as a source of lead exposure in the United States. *Public Health Reports*, 132(3), 289–293. <https://doi.org/10.1177/0033354917700109>
- Darko, B., Ayim, I., & Voegborlo, R. B. (2014). Heavy metal content in mixed and unmixed seasonings on the Ghanaian market. *African Journal of Food Science*, 8(1), 14–19. <https://doi.org/10.5897/ajfs2013.1107>
- De La Calle, I., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2013). Fast

- method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food Chemistry*, 138(1), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.105>
- de Santiago-Martín, A., Meffe, R., Teijón, G., Martínez Hernández, V., López-Heras, I., Alonso Alonso, C., Arenas Romasanta, M., & de Bustamante, I. (2020). Pharmaceuticals and trace metals in the surface water used for crop irrigation: Risk to health or natural attenuation? *Science of the Total Environment*, 705, 135825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135825>
- Dourado, M. T. (2012). Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas. *Tese (Doutorado Em Ciências) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.*, 120 f.
- Duarte, M. de L. R., Poltronieri, M. C., Chu, E. Y., Oliveira, R. F. de, Lemos, O. F., Benchimol, R. L., Conceição, H. E. O. da, & Souza, G. F. de. (2006). *Coleção Plantar: A Cultura da Pimenta-do-reino*. EMBRAPA.
- Dutta, S., & Bhattacharjee, P. (2016). Modeling of supercritical carbon dioxide extraction of piperine from Malabar black pepper. *Materials Today: Proceedings*, 3(10), 3238–3252. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.005>
- EMBRAPA. (2004). *Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino*. EMBRAPA.
- FAO. (2021). *Pepper (piper spp.): Production/Crops*. Food And Agriculture Organization of the United Nations: Statistical Division (FAOSTAT). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Ferreira, C., Soares, D. C., Barreto-Junior, C. B., Nascimento, M. T., Freire-De-Lima, L., Delorenzi, J. C., Lima, M. E. F., Atella, G. C., Folly, E., Carvalho, T. M. U., Saraiva, E. M., & Pinto-Da-Silva, L. H. (2011). Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*, 72(17), 2155–2164. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.006>
- Fett, M. S., Mariot, R. F., Ortiz, R. S., Avila, E., & de Oliveira Camargo, F. A. (2020). Geographic origin determination of Brazilian Cannabis sativa L. (Marihuana) by multi-element concentration. *Forensic Science International*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110459>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 213–226.
- Giacomino, A., Abollino, O., Casanova, C., La Gioia, C., Magi, E., & Malandrino, M. (2015). Determination of the total and bioaccessible contents of essential and potentially toxic elements in ayurvedic formulations purchased from different commercial channels. *Microchemical Journal*, 120, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.12.005>

- Gleason, K., Shine, J. P., Shobnam, N., Rokoff, L. B., Suchanda, H. S., Ibne Hasan, M. O. S., Mostofa, G., Amarasiriwardena, C., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Kile, M. L., Bellinger, D. C., Christiani, D. C., Wright, R. O., & Mazumdar, M. (2014). Contaminated Turmeric Is a Potential Source of Lead Exposure for Children in Rural Bangladesh. *Journal of Environmental and Public Health*, 2014, 3–8. <https://doi.org/10.1155/2014/730636>
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374–381.
- Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., & Nikzad, M. (2017a). Piperine - The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 124–140. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12246>
- Gorgani, L., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., & Nikzad, M. (2017b). Sequential Microwave-Ultrasound-Assisted Extraction for Isolation of Piperine from Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 10, 2199–2207.
- Guclu, G., Keser, D., Kelebek, H., Keskin, M., Emre Sekerli, Y., Soysal, Y., & Selli, S. (2021). Impact of production and drying methods on the volatile and phenolic characteristics of fresh and powdered sweet red peppers. *Food Chemistry*, 338(September 2020), 128129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128129>
- Gupta, S. K., Bansal, P., Bhardwaj, R. K., & Velpandian, T. (2000). Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. *Pharmacological Research*, 41(6), 657–662. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0640>
- Hensawang, S., & Chanpiwat, P. (2018). Analysis and probabilistic risk assessment of bioaccessible arsenic in polished and husked jasmine rice sold in Bangkok. *Chemosphere*, 207, 637–648.
- IBGE. (2021). *Produção Agrícola - Lavoura Permanente*. IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0?localidade1=32&localidade2=15&tipo=grafico&indicador=12035>
- INMETRO. (2016). Doq-Cgcre-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia*, 31.
- INMETRO. (2020). Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008, revisão 08. 2020, 30. http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008%0Ahttp://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_08.pdf
- ISO. (1997). *9235:1997 Aromatic natural raw materials - Vocabulary*. ISO.
- Jacxsens, L., Pratheeb, Yogendrarajaha, & De Meulenaer, B. (2016). Risk Assessment of Mycotoxins and Predictive Mycology in Sri Lankan Spices: Chilli

- and Pepper. *Procedia Food Science*, 6, 326–330.
- Jawad, I. (2016). Determination of heavy metals in spices and medical herbs available on the Iraq Markets. *Advances in Environmental Biology*, 10(January), 66–69.
- Jayatunga, G. K., & Amarasinghe, B. M. W. P. K. (2019). Drying kinetics, quality and moisture diffusivity of spouted bed dried Sri Lankan black pepper. *Journal of Food Engineering*, 263, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.023>
- Jeleń, H. H., & Gracka, A. (2015). Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, 1418, 200–209.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B., & Geissler, M. (2002). Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography– mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A*, 976(1–2), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00376-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00376-X)
- Kapoor, I. P. S., Singh, B., Singh, G., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2009). Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5358–5364. <https://doi.org/10.1021/jf900642x>
- Karadaş, C., & Kara, D. (2012). Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. *Food Chemistry*, 130(1), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.006>
- Kasibhatta, R., & Naidu, M. U. R. (2007). Influence of piperine on the pharmacokinetics of nevirapine under fasting conditions: A randomised, crossover, placebo-controlled study. *Drugs in R and D*, 8(6), 383–391. <https://doi.org/10.2165/00126839-200708060-00006>
- Kennish, M. J. (1997). *Practical handbook of Estuarine and Marine pollution* (2^a). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203742488>
- Kozukue, N., Park, M. S., Choi, S. H., Lee, S. U., Ohnishi-Kameyama, M., Levin, C. E., & Friedman, M. (2007). Kinetics of light-induced cis-trans isomerization of four piperines and their levels in ground black peppers as determined by HPLC and LC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7131–7139. <https://doi.org/10.1021/jf070831p>
- Krause, M., Vieira, L. V., Cunha, T. P., Brandão, G. P., Filgueiras, P. R., & Carneiro, M. T. W. D. (2020). Multi-Element Evaluation in Black Pepper (*Piper nigrum* L.) According to the Processing. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(1), 135–142. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190141>
- Lemos, O. F. de, Tremacoldi, C. R., & Poltronieri, M. C. (2014). Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no

- Estado do Pará. In *Embrapa* (1^a). Embrapa.
- Li, Y. xin, Zhang, C., Pan, S., Chen, L., Liu, M., Yang, K., Zeng, X., & Tian, J. (2020). Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black and white pepper (*Piper nigrum* L.) in five provinces of southern China. *LWT - Food Science and Technology*, *117*, 108644. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108644>
- Liang, J., Sun, J., Chen, P., Frazier, J., Benefield, V., & Zhang, M. (2021). Chemical analysis and classification of black pepper (*Piper nigrum* L.) based on their country of origin using mass spectrometric methods and chemometrics. *Food Research International*, *140*(October 2020), 109877.
- Lin, C. G., Schaidler, L. A., Brabander, D. J., & Woolf, A. D. (2010). Pediatric lead exposure from Imported indian spices and cultural powders. *Pediatrics*, *125*(4). <https://doi.org/10.1542/peds.2009-1396>
- Liu, H., Zeng, F., Wang, Q., Ou, S., Tan, L., & Gu, F. (2013). The effect of cryogenic grinding and hammer milling on the flavour quality of ground pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Chemistry*, *141*(4), 3402–3408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.052>
- Lopes, J. F. D. (2014). *Cultivo e processamento de plantas aromáticas*. Universidade Nova de Lisboa.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2^a). Eurachem Guide. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00500-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00500-2)
- Matloob, M. H. (2016). Using stripping voltammetry to determine heavy metals in cooking spices used in Iraq. *Polish Journal of Environmental Studies*, *25*(5), 2057–2070. <https://doi.org/10.15244/pjoes/62401>
- Meghwal, M., & Goswami, T. (2012). Chemical Composition, Nutritional, Medicinal And Functional Properties of Black Pepper: A Review. *Open Access Scientific Reports*, *1*(2), 1–5. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.1>
- Menon, A. N., & Padmakumari, K. P. (2005). Essential oil composition of four major cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.)—IV. *Journal of Essential Oil Research*, *17*(2), 206–208. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698877>
- Menon, A. N., Padmakumari, K. P., Jayalekshmy, A., Gopalakrishnan, M., & Narayanan, C. S. (2000). Essential oil composition of four popular indian cultivars of black pepper (*Piper Nigrum* L.). *Journal of Essential Oil Research*, *12*(4), 431–434. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699558>
- Molnár, P., Gustafson, P., Johannesson, S., Boman, J., Barregård, L., & Sällsten, G. (2005). Domestic wood burning and PM_{2.5} trace elements: Personal exposures, indoor and outdoor levels. *Atmospheric Environment*, *39*(14), 2643–2653. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.01.016>

- Morais, L. A. S. De. (2009). Influência Dos Fatores Abióticos Na Composição Química Dos Óleos Essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2), 4050–4063.
- Morshed, S., Ahmad, M., & Junayed, M. (2017). Physicochemical Characteristics of Essential Oil of Black Pepper (*Piper nigrum*) Cultivated in Chittagong, Bangladesh. *Journal of Food Quality and Hazards Control. and Testing Institutions*, 4(3), 66–69.
- Muñoz-Redondo, J. M., Bertoldi, D., Tonon, A., Ziller, L., Camin, F., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Tracing the geographical origin of Spanish mango (*Mangifera indica* L.) using stable isotopes ratios and multi-element profiles. *Food Control*, 125(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107961>
- Nair, K. P. P. (2011). *Agronomy and Economy of Black Pepper and Cardamom: The “King” and “Queen” of spices* (1^a). Elsevier.
- Ncube, E., & Phiri, B. (2015). Concentrations of heavy metals in Eucalyptus and Pinus wood sawdust and smoke, Copperbelt province, Zambia. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, 17(3), 585–596. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000052>
- Nunes, L. C., De Carvalho, G. G. A., Santos, D., & Krug, F. J. (2014). Determination of Cd, Cr and Pb in phosphate fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 97, 42–48.
- Ocvirk, M., Nečemer, M., & Košir, I. J. (2019). The determination of the geographic origins of hops (*Humulus lupulus* L.) by multi-elemental fingerprinting. *Food Chemistry*, 277(May 2018), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.070>
- Olalere, O. A., Abdurahman, N. H., Yunus, R. bin M., Alara, O. R., & Akbari, S. (2018). Evaluation of optimization parameters in microwave reflux extraction of piperine-oleoresin from black pepper (*Piper nigrum*). *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.07.006>
- Orav, A., Stulova, I., Kailas, T., & Müürisepp, M. (2004). Effect of Storage on the Essential Oil Composition of *Piper nigrum* L. Fruits of Different Ripening States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2582–2586. <https://doi.org/10.1021/jf030635s>
- Özcan, M. M., & Akbulut, M. (2007). Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. *Food Chemistry*, 106(2), 852–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.045>
- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (2008). *Chemistry of Spices* (1^a). CABI.
- Peter, K. V. (2012). *Handbook of Herbs and Spices Vol. 1* (2^a). Woodhead Publishing.

- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, *311*(5762), 808–811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Polovka, M., & Suhaj, M. (2010). The effect of irradiation and heat treatment on composition and antioxidant properties of culinary herbs and spices -a review. *Food Reviews International*, *26*(2), 138–161. <https://doi.org/10.1080/87559121003590227>
- Potorti, A. G., Bua, G. D., Lo Turco, V., Ben Tekaya, A., Beltifa, A., Ben Mansour, H., Dugo, G., & Di Bella, G. (2020). Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chemistry*, *313*(December 2019), 126094. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126094>
- Pradeep, C. R., & Kuttan, G. (2004). Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. *International Immunopharmacology*, *4*, 1795–1803. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.08.005>
- Prado, R. D. M. (2010). *Nutrição de plantas* (1^a). Editora Unesp.
- Preedy, V. R. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (1^a). Elsevier.
- Qian, L., Zhang, C., Zuo, F., Zheng, L., Li, D., Zhang, A., & Zhang, D. (2019). Effects of fertilizers and pesticides on the mineral elements used for the geographical origin traceability of rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, *83*(August), 103276. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103276>
- Rahman, M., Islam, M. A., & Khan, R. A. (2018). Characterization of chemical elements in common spices of Bangladesh for dietary intake and possible health risk assessment by INAA and AAS techniques. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *318*(2), 1347–1357. <https://doi.org/10.1007/s10967-018-6222-5>
- Ranaweera, R. K. R., Gilmore, A. M., Capone, D. L., Bastian, S. E. P., & Jeffery, D. W. (2021). Authentication of the geographical origin of Australian Cabernet Sauvignon wines using spectrofluorometric and multi-element analyses with multivariate statistical modelling. *Food Chemistry*, *335*(July 2020), 127592.
- Rathnawathie, M., & Buckle, K. A. (1983). Determination of piperine in pepper (*Piper nigrum*) using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *264*, 316–320. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)95038-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)95038-1)
- Rathod, S. S., & Rathod, V. K. (2014). Extraction of piperine from *Piper longum* using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, *58*, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.040>
- Ravindran, P. N. (2006). *Black Pepper: Piper Nigrum* (1^a). Harwood Academic

Publishers.

- Reddy, S. V., Srinivas, P. V., Praveen, B., Kishore, K. H., Raju, B. C., Murthy, U. S., & Rao, J. M. (2004). Antibacterial constituents from the berries of *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, *11*(7–8), 697–700. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.04.004>
- Ribeiro-Filho, N., Linforth, R., Powell, C. D., & Fisk, I. D. (2021). Influence of essential inorganic elements on flavour formation during yeast fermentation. *Food Chemistry*, *361*(April), 130025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130025>
- Ribeiro, T. S., Freire-De-Lima, L., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Heise, N., & De Lima, M. E. F. (2004). Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *14*(13), 3555–3558. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.04.019>
- Richter, B., Gurk, S., Wagner, D., Bockmayr, M., & Fischer, M. (2019). Food authentication: Multi-elemental analysis of white asparagus for provenance discrimination. *Food Chemistry*, *286*(January), 475–482.
- Seddigi, Z. S., Kandhro, G. A., Shah, F., Danish, E., & Soyak, M. (2016). Assessment of metal contents in spices and herbs from Saudi Arabia. *Toxicology and Industrial Health*, *32*(2), 260–269. <https://doi.org/10.1177/0748233713500822>
- Serrano, L. A. L., Novak, L. R., & Lima, I. de M. (2008). *Colheita e Pós-colheita da pimenta-do-reino*. INCAPER.
- Silva, J. de S. e, Lopes, R. P., Vitor, D. G., & Donzeles, S. M. L. (2014). *Comunicado Técnico: Forno a Lenha para Secagem de Café e Grãos* (p. 14). EMBRAPA.
- SIMÕES, C. M. O. ., SCHENKEL, E. P. ., GOSMANN, G. ., MELLO, J. C. P. ., MENTZ, L. A. ., & P.R., P. (2010). *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (6^a). UFRGS/UFSC.
- Singh, V., & Garg, A. N. (2006). Availability of essential trace elements in Indian cereals, vegetables and spices using INAA and the contribution of spices to daily dietary intake. *Food Chemistry*, *94*(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.053>
- Soliman, N. F. E. (2015). Metals contents in spices and herbs available on the Egyptian market: assessment of potential human health risk. *The Open Conference Proceedings Journal*, *6*(1), 24–29. <https://doi.org/10.2174/2210289201506010024>
- Suliburska, J., Kaczmarek, K., & Sionkowski, S. (2007). Evaluation of iron, zinc and copper contents in selected spices available on the Polish market. *Polish J. of Environ. Stud.*, *16*(1), 97–100.
- Suresh, D., Manjunatha, H., & Srinivasan, K. (2007). Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma*

- longa), red pepper (*Capsicum annuum*) and black pepper (*Piper nigrum*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.10.002>
- T, J., & W, G. (1999). Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration. *European Food Research and Technology*, 15, 16–21.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology* (3^a). Sinauer Associates. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S. N., Perveen, S., & Mahmood, Z. A. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S461–S468. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60275-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60275-3)
- USDA. (2019). *FoodData Central: Spices, pepper, black*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170931/nutrients>
- Vellaichamy, L., Balakrishnan, S., Panjamurthy, K., Manoharan, S., & Alias, L. M. (2009). Chemopreventive potential of piperine in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.01.008>
- Veloso, C. A. C., & Muraoka, T. (1993). DIAGNÓSTICO DE SINTOMAS DE DEFICIÊNCIA DE MACRONUTRIENTES EM PIMENTEIRA DO REINO (*Piper nigrum*, L.). *Scientia Agricola*, 50(2), 232–236.
- VELOSO, C. A. C., MURAOKA, T., MALAVOLTA, E., & CARVALHO, J. G. DE. (1998). Deficiências de micronutrientes em pimenteira-do-reino. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 33(11), 1883–1888. <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/viewFile/5010/7166>
- Vinha, M., & Lima, I. D. M. (2018). Contaminantes que comprometem a segurança da pimenta-do-reino ao longo de sua cadeia produtiva. *Incaper Em Revista*, 8, 55–67.
- Waje, C. K., Kim, H. K., Kim, K. S., Todoriki, S., & Kwon, J. H. (2008). Physicochemical and microbiological qualities of steamed and irradiated ground black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4592–4596. <https://doi.org/10.1021/jf8002015>
- Wang, B., Zhang, Y., Huang, J., Dong, L., Li, T., & Fu, X. (2017). Anti-inflammatory activity and chemical composition of dichloromethane extract from *piper nigrum* and *P. longum* on permanent focal cerebral ischemia injury in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(3), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.003>
- Wang, M., Chittiboyina, A. G., Parcher, J. F., Ali, Z., Ford, P., Zhao, J., Avula, B., Wang, Y. H., & Khan, I. A. (2018). *Piper nigrum* Oil - Determination of Selected

Terpenes for Quality Evaluation. *Planta Medica*, 85(3), 185–194.
<https://doi.org/10.1055/a-0782-0548>

Weil, M., Shum Cheong Sing, A., Méot, J. M., Boulanger, R., & Bohuon, P. (2017). Impact of blanching, sweating and drying operations on pungency, aroma and color of *Piper borbonense*. *Food Chemistry*, 219, 274–281.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.144>

Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, 37–52.
<https://doi.org/10.5455/ijlr.20170415115235>

Yu, G. W., Cheng, Q., Nie, J., Wang, P., Wang, X. J., Li, Z. G., & Lee, M. R. (2017). DES-based microwave hydrodistillation coupled with GC-MS for analysis of essential oil from black pepper (*Piper nigrum*) and white pepper. *Analytical Methods*, 9(48), 6777–6784. <https://doi.org/10.1039/c7ay02072d>

Zachariah, T. J., Safeer, A. L., Jayarajan, K., Leela, N. K., Vipin, T. M., Saji, K. V., Shiva, K. N., Parthasarathy, V. A., & Mammooty, K. P. (2010). Correlation of metabolites in the leaf and berries of selected black pepper varieties. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 418–422. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.017>

Zhao, H., Tang, J., & Yang, Q. (2021). Effects of geographical origin, variety, harvest season, and their interactions on multi-elements in cereal, tuber, and legume crops for authenticity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 100(December 2020), 103900.

APÊNDICE A: CÁLCULO DE INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIPERINA

| Fonte de incerteza | Componente | Incerteza de entrada [$\mu(x_i)$] | Unidade | Distribuição de Probabilidade | Divisor [k] | Incerteza estimada na unidade de entrada | Coefficiente de Sensibilidade [C] | Incerteza padrão | Nº de graus de liberdade [v] | Contribuição Relativa (%) | Explicação/Fontes/Notas | Cálculo de V_{eff} |
|--|------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------|--|-----------------------------------|------------------|------------------------------|---------------------------|---|----------------------|
| Incerteza da balança | m | 3.00E-04 | g | t-Student | 2.00 | 1.50E-04 | -20 | -3.00E-03 | infinito | 0.00% | o valor da incerteza de entrada e o fator de abrangencia (k) foram obtidos do certificado da balança | 0 |
| Resolução da balança | m | 5.00E-05 | g | retangular | 1.73 | 2.89E-05 | -20 | -5.77E-04 | infinito | 0.00% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo 1/2 do último dígito significante da balança. Por apresentar distribuição retangular, $k = \sqrt{3}$ | 0 |
| incerteza da micropipeta de 10mL | Vs | 1.00E-01 | mL | triangular | 2.45 | 4.08E-02 | 1 | 4.08E-02 | infinito | 0.54% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo a resolução da micropipeta variável. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| resolução da micropipeta de 10mL | Vs | 5.00E-02 | mL | retangular | 1.73 | 2.89E-02 | 1 | 2.89E-02 | infinito | 0.27% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo 1/2 do último dígito significante da micropipeta. Por apresentar distribuição retangular, $k = \sqrt{3}$ | 0 |
| Efeito de variação da temperatura sobre volume | Vs | 5.00E-02 | mL | triangular | 2.45 | 2.04E-02 | 1 | 2.04E-02 | infinito | 0.13% | Varição da temperatura em relação a temperatura de calibração. A incerteza de entrada foi obtida pela fórmula: $(\Delta T \alpha) \times \text{Volume}$, onde α é $1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ para líquidos orgânicos. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| incerteza da micropipeta de 1mL | Vf | 1.00E-03 | mL | triangular | 2.45 | 4.08E-04 | 10 | 4.08E-03 | infinito | 0.01% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo a resolução da micropipeta variável. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| resolução da micropipeta de 1mL | Vf | 5.00E-04 | mL | retangular | 1.73 | 2.89E-04 | 10 | 2.89E-03 | infinito | 0.00% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo 1/2 do último dígito significante da micropipeta. Por apresentar distribuição retangular, $k = \sqrt{3}$ | 0 |
| Efeito de variação da temperatura sobre volume | Vf | 5.00E-03 | mL | triangular | 2.45 | 2.04E-03 | 10 | 2.04E-02 | infinito | 0.13% | Varição da temperatura em relação a temperatura de calibração. A incerteza de entrada foi obtida pela fórmula: $(\Delta T \alpha) \times \text{volume}$, onde α é $1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ para líquidos orgânicos. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| incerteza da micropipeta de 10 μ L | Vi | 1.00E-04 | mL | triangular | 2.45 | 4.08E-05 | -1000 | -4.08E-02 | infinito | 0.54% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo a resolução da micropipeta variável. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| resolução da micropipeta de 10 μ L | Vi | 5.00E-05 | mL | retangular | 1.73 | 2.89E-05 | -1000 | -2.89E-02 | infinito | 0.27% | o valor da incerteza de entrada foi estimada como sendo 1/2 do último dígito significante da micropipeta. Por apresentar distribuição retangular, $k = \sqrt{3}$ | 0 |
| Efeito de variação da temperatura sobre volume | Vi | 5.00E-05 | mL | triangular | 2.45 | 2.04E-05 | -1000 | -2.04E-02 | infinito | 0.13% | Varição da temperatura em relação a temperatura de calibração. A incerteza de entrada foi obtida pela fórmula: $(\Delta T \alpha) \times \text{Volume}$, onde α é $1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ para líquidos orgânicos. Por apresentar distribuição triangular, $k = \sqrt{6}$ | 0 |
| Incerteza da curva analítica | C | 1.70E-01 | $\mu\text{g/mL}$ | normal | 1.00 | 1.70E-01 | 2 | 3.40E-01 | 29 | 37.34% | A incerteza de entrada foi calculada a partir da incerteza associada à interpolação na curva analítica ajustada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Por apresentar distribuição normal dos resíduos, $k = 1$ | 0.00046 |
| Incerteza da precisão | C | 3.91E-01 | mg/g | normal | 1.00 | 3.91E-01 | 1 | 3.91E-01 | 45 | 49.35% | Incerteza de entrada sendo o desvio padrão relativo das leituras, aplicado ao mensurando. Por apresentar distribuição normal dos resíduos, $k = 1$ | 0.00052 |
| Recuperação | C | 1.87E-01 | mg/g | normal | 1.00 | 1.87E-01 | 1 | 1.87E-01 | 18 | 11.29% | A extração raramente é completa e pode adicionar ou incluir interferentes. A incerteza foi obtida a partir do desvio padrão da média dos experimentos de recuperação, fórmula: $\text{Recuperação} / \sqrt{\text{número de experimentos}}$. Por apresentar distribuição normal, $k = 1$ | 6.8E-05 |

| | |
|---|--------|
| Incerteza combinada (μ_c): | 0.557 |
| Graus de liberdade efetivo (v_{eff}): | 91 |
| Fator de abrangência (k): | 2.03 |
| Incerteza expandida (U): | 1.130 |
| Incerteza expandida relativa (U)%: | 11.30% |

Incerteza de entrada [u(x_i)]: incerteza expandida de cada fonte de incerteza.

Distribuição de Probabilidade: distribuição de probabilidade que está associada à respectiva incerteza expandida.

Divisor [k]: k é o fator de abrangência e varia conforme a distribuição de probabilidade.

Incerteza estimada na unidade de entrada: é a incerteza padrão dividida pelo fator de abrangência de cada fonte de incerteza.

Coefficiente de Sensibilidade [c_i]: é a derivada parcial do mensurando em relação a cada fonte de incerteza, convertendo a incerteza padrão de cada variável para a mesma unidade de medida do mensurando.

Incerteza padrão: é a incerteza estimada na unidade de entrada multiplicada pelo coeficiente de sensibilidade.

Nº de graus de liberdade [v_i]: graus de liberdade associados à incerteza expandida.

Contribuição Relativa (%): Contribuição das fontes individuais de incerteza em porcentagem.

V_{eff}: é o grau de liberdade efetivo. Calculada a partir da equação:

$$v_{eff} = \frac{\mu_c^4}{\sum \frac{(\mu_i \cdot C_i)^4}{V_i}}$$

Equação da incerteza associada à interpolação na curva analítica:

$$\mu_{reta} = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\left[\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

$$S_y = \sqrt{\left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - a - b \times x_i)^2}{N - 2} \right]}$$