

APLICACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE PIMIENTA NEGRA: UNA APROXIMACIÓN METABOLÓMICA AL ESTUDIO DEL ORIGEN GEOGRÁFICO Y PROCESADO

Araceli Rivera-Pérez, Roberto Romero-González, Antonia Garrido Frenich
Grupo de Investigación “Química Analítica de Contaminantes”, Departamento de Química y Física, Universidad de Almería, Almería, España

Introducción

La pimienta negra, fruto de la planta *Piper nigrum* L., se trata de uno de los condimentos más consumidos mundialmente debido a sus propiedades aromáticas y sabor característico [1]. Entre los principales productores de dicha especia se encuentran diferentes regiones tropicales tales como India, Brasil, Vietnam o Sri Lanka, entre otros [2].

La composición química de la pimienta negra está estrechamente relacionada con sus propiedades organolépticas. Además, dicha composición se ve influenciada por diversos factores, incluyendo desde aquellos relacionados con el origen geográfico, como los climáticos, hasta aquellos factores postcosecha derivados de, por ejemplo, el procesado al que se somete la especia (procesos de esterilización, secado, almacenamiento, etc.) [3]. De esta forma, dichas variaciones se verán reflejadas en la composición química generando un perfil metabólico característico de la muestra y representativo de una cualidad directamente relacionada con la autenticidad, como por ejemplo el origen o el procesado.

En este contexto, el análisis no dirigido o *fingerprinting* (obtención de la huella dactilar), a través del cual se obtiene el perfil metabólico completo que refleja la composición química de una muestra [4], en combinación con herramientas quimiométricas para la extracción de información relevante (ej. análisis multivariante), se ha convertido en una estrategia valiosa para asegurar la autenticidad, trazabilidad y seguridad de productos botánicos tales como las especias. Con este fin, en los últimos años, se han aplicado métodos basados en el análisis *fingerprinting* mediante cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) [5] o cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) [6] acoplados a espectrometría de masas para la autenticación de otras especias tales como el azafrán o el jengibre, respectivamente. Sin embargo, hasta el momento, el potencial de combinar dichas técnicas cromatográficas con la detección avanzada mediante espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) empleando analizadores híbridos del tipo cuadrupolo(Q)-Orbitrap no ha sido evaluado para estudios de autenticación y fraude alimentario en pimienta negra.

En este contexto, en el grupo de investigación “Química Analítica de Contaminantes” de la Universidad de Almería se han aplicado por primera vez metodologías analíticas para la autenticación y trazabilidad de la pimienta negra basadas en la obtención de la huella dactilar de la especia mediante técnicas cromatográficas (GC y UHPLC) y HRMS combinadas con herramientas de la metabolómica (análisis multivariante) [7, 8]. Dicho enfoque metabólico no dirigido ha permitido estudiar la influencia del origen geográfico (diferenciación de tres orígenes geográficos: Brasil, Vietnam y Sri Lanka) y del procesado (especia esterilizada o no esterilizada) en la composición química de la pimienta negra.

Muestras analizadas

En este estudio, se analizaron un total de 20 muestras de tres orígenes geográficos distintos y sometidas a dos procesados diferentes. Las muestras fueron proporcionadas por Sabater Spices (Murcia, España). Los perfiles metabólicos de 10 muestras procedentes de Brasil, 6 muestras de Sri Lanka y 4 de Vietnam fueron obtenidos a fin de garantizar su origen geográfico y evaluar el impacto de factores relacionados con la región de origen en la composición química de la pimienta negra. Por otro lado, el 50 % de las muestras fueron sometidas a un proceso de esterilización (tratamiento térmico por corriente de vapor) a fin de aumentar la calidad final del producto y garantizar la ausencia de patógenos y/o humedad. Así, también se investigó el impacto de dicho procesado en el perfil metabólico mediante la comparación de las huellas dactilares de muestras de pimienta negra esterilizadas y no esterilizadas.

Obtención de las huellas dactilares (análisis *fingerprinting*)

Para obtener las huellas dactilares de las muestras de pimienta negra se empleó un enfoque metabólico no dirigido (análisis *fingerprinting*) basado en la combinación de técnicas de GC y UHPLC con detección por HRMS empleando analizadores híbridos del tipo Q-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

Los extractos de pimienta negra se obtuvieron por triplicado aplicando un método de extracción asistido por ultrasonidos caracterizado por su sencillez y alto rendimiento. Los espectros de masa exacta fueron adquiridos por ionización electrónica a 70 eV (para el análisis por GC-HRMS) o por ionización por *electrospray* en polaridad positiva y negativa (análisis UHPLC-HRMS)

empleando el modo de adquisición barrido completo de iones (*full scan*).

Procesado de los datos: Flujo de trabajo

Antes de proceder al análisis multivariante de las huellas dactilares obtenidas mediante UHPLC/GC-HRMS, los datos recogidos fueron procesados usando el *software* Compound Discoverer™ versión 3.2 (Thermo Fisher Scientific).

El primer paso consistió en la búsqueda de picos cromatográficos y los espectros de masas correspondientes. A continuación, se procedió al alineamiento de los tiempos de retención entre las muestras estudiadas, seguido de una etapa de filtración y eliminación de señales inespecíficas. Posteriormente, se llevó a cabo la normalización de las señales obtenidas. Finalmente, las huellas dactilares fueron sometidas a análisis estadístico multivariante para identificar aquellos metabolitos que más contribuyeron a la separación entre las clases de orígenes y procesados estudiados (llamados marcadores).

Resultados: Análisis estadístico multivariante

El análisis multivariante de las huellas dactilares se realizó empleando el *software* estadístico SIMCA® versión 17 (Sartorius, Umeå, Suecia). Para ello, los datos fueron previamente escalados por Pareto y sometidos a transformación logarítmica.

Análisis exploratorio

Para el análisis exploratorio se empleó el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) a fin de evaluar la calidad de los datos quimiométricos, detectar posibles *outliers* y buscar tendencias de agrupamiento entre las muestras.

A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestra el gráfico de dispersión de los *scores* obtenido para el análisis PCA de las huellas dactilares obtenidas mediante el análisis por GC-HRMS (cada punto corresponde a una muestra). Se seleccionaron las dos primeras componentes que, en este caso, explicaron una variabilidad del 51,8 %.

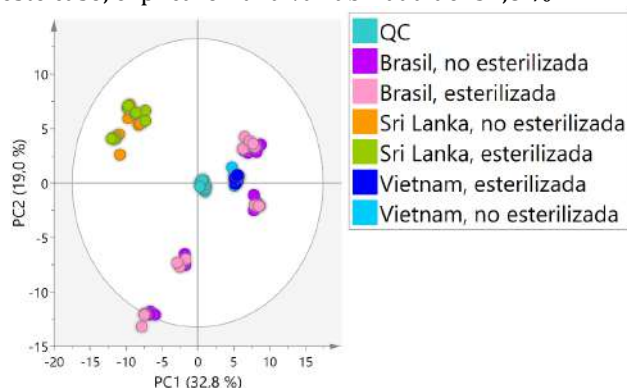


Figura 1. Análisis exploratorio obtenido mediante PCA que muestra el patrón de agrupamiento de pimienta negra de diferentes orígenes geográficos y procesados en base a sus huellas dactilares obtenidas mediante GC-HRMS.

Este tipo de análisis no supervisado reveló una clara diferenciación de las muestras procedentes de Sri Lanka con respecto a la pimienta negra de origen brasileño o vietnamita, cuyas huellas dactilares presentarían mayores similitudes. Por otro lado, se observó la estrecha relación de cada muestra esterilizada con su correspondiente muestra no esterilizada. Además, los puntos de control de calidad (*Quality Control*, QC) correspondientes a una muestra compuesta por alícuotas de todos los extractos se encontraron satisfactoriamente agrupados y localizados en el centro de la elipse, demostrando la robustez del análisis instrumental y quimiométrico.

Análisis discriminante

Para el análisis discriminante, se construyeron cuatro modelos estadísticos basados en la técnica de análisis supervisado denominada proyección ortogonal sobre estructuras latentes-análisis discriminante (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*, OPLS-DA) a fin de clasificar las muestras de pimienta en base a su origen geográfico y modo de procesado empleado las huellas dactilares obtenidas por análisis *fingerprinting* mediante GC-HRMS y UHPLC-HRMS. Del total de 60 huellas dactilares (20 muestras analizadas por triplicado), el 80 % de las mismas fueron utilizadas para la construcción y calibración de los modelos estadísticos OPLS-DA, mientras el 20 % restante no se incluyó en la construcción de los modelos y se empleó como el conjunto de muestras de predicción para la validación externa de los modelos. Con ello, se evaluó la tasa de clasificación correcta (en porcentaje, %) proporcionada por los modelos como una medida de la capacidad de predicción de estos para futuras muestras de pimienta. En las Figuras 2 y 3 se muestran los gráficos de dispersión de los *scores* para la discriminación de muestras en base al origen geográfico y modo de procesado, respectivamente.

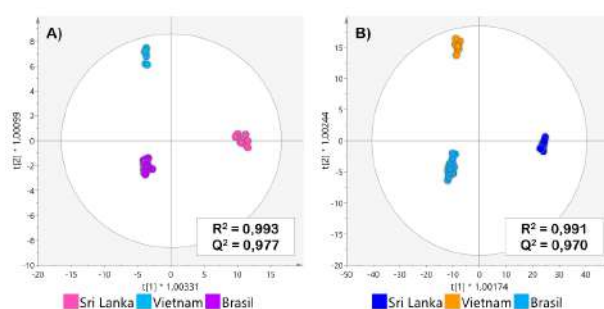


Figura 2. Análisis discriminante OPLS-DA que muestra la diferenciación de muestras en base a su origen geográfico (Brasil, Sri Lanka o Vietnam). Huellas dactilares obtenidas mediante GC-HRMS (A) y UHPLC-HRMS (B).

Atendiendo al origen geográfico (Figura 2), el análisis OPLS-DA mostró una clara diferenciación de las muestras en función del país de origen. Estos resultados muestran la influencia de las condiciones climáticas encontradas en cada región en la huella dactilar de la especia. Además, los valores obtenidos para el ajuste y

capacidad de predicción del modelo fueron $R^2 = 0,991-0,993$ y $Q^2 = 0,970-0,977$, respectivamente, indicando una excelente separación entre los tres grupos de muestras como consecuencia de las diferencias significativas existentes entre los perfiles metabolómicos en función del origen geográfico.

Por otro lado, el análisis OPLS-DA permitió la discriminación entre muestras esterilizadas y no esterilizadas (Figura 3), obteniéndose buenos valores de ajuste y predicción para futuras muestras ($R^2 = 0,989-0,990$; $Q^2 = 0,899-0,959$), poniendo de manifiesto el importante papel que juega el modo de procesado en la composición química de la pimienta negra reflejándose en cambios metabolómicos significativos en la huella dactilar.

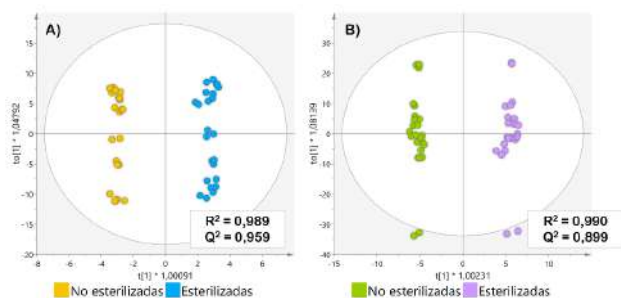


Figura 3. Análisis discriminante OPLS-DA que muestra la diferenciación de muestras en base a su modo de procesado (esterilizadas o no esterilizadas). Huellas dactilares obtenidas mediante GC-HRMS (A) y UHPLC-HRMS (B).

Adicionalmente, dichos modelos fueron externamente validados considerando la tasa correcta de clasificación del 20% de muestras no incluidas durante la construcción de los modelos. El análisis *fingerprinting* tanto por GC-HRMS como por UHPLC-HRMS permitió la clasificación de las muestras de predicción con un porcentaje de acierto del 100 % tanto para el origen como para el procesado.

Identificación de marcadores

Tras realizar el análisis multivariante, se estudiaron aquellas variables (correspondientes a metabolitos) que más contribuyeron a la discriminación de las muestras a fin de ser utilizados como potenciales marcadores representativos de la autenticidad de la pimienta negra de diferentes orígenes y procesados. Para ello, se empleó el análisis VIP (*Variable Importance in Projection*), una herramienta comúnmente utilizada para encontrar aquellas variables que más contribuyen a la discriminación de grupos a partir de los modelos OPLS-DA. Los criterios utilizados para la selección de las variables se describen a continuación: un valor VIP > 1,5 obtenido a partir del análisis multivariante (OPLS-DA) y p-valores < 0,05 (diferencias significativas en las concentraciones de los metabolitos), obtenidos a partir de análisis univariante mediante t-test (para el modelo generado para el procesado) o análisis de varianza (ANOVA) con test de Tukey (para el origen geográfico).

Tal como se muestra en la Tabla 1, se seleccionaron 12 marcadores de la huella dactilar de pimienta negra obtenida por GC-HRMS y otros 8 metabolitos obtenidos del análisis por UHPLC-HRMS resultaron ser potenciales marcadores para la diferenciación de las clases de origen y procesado estudiadas.

Tabla 1. Metabolitos seleccionados como potenciales marcadores para la diferenciación geográfica y de procesado de las muestras de pimienta negra.

N.º	Identificación tentativa	Valor VIP
Análisis GC-HRMS		
1	Eugenol	3,46 (procesado)
2	Ácido octadecanoico	2,44 (procesado)
3	γ-Tocoferol	2,22 (procesado)
4	trans-Anetol	2,14 (procesado)
5	Proximadiol	2,06 (origen)
6	Dehidroabietal	2,04 (origen)
7	Cuminaldehído	2,01 (origen)
8	1-(m-Metoxicinamoil)pirrolidina	2,00 (procesado)
9	(+)-Pinanediol	1,87 (origen)
10	Apiol	1,76 (origen)
11	α-Cubebeno	1,69 (procesado)
12	Valerenol	1,68 (origen)
Análisis UHPLC-HRMS		
13	Reynosin	2,37 (origen)
14	Artabsinólida D	2,08 (origen)
15	Tatridin B	1,83 (origen)
16	Ácido (12E)-9,10-dihidroxi-12-octadecenoico	2,62 (procesado)
17	Sitostenona	1,85 (procesado)
18	Ácido 9-hidroperoxi-10E-octadecenoico	1,78 (procesado)
19	Ácido 10,16-dihidroxi-hexadecanoico	1,75 (procesado)
20	Ácido 9,10-dihidroxi-esteárico	1,57 (procesado)

La identificación tentativa de los marcadores detallados en la Tabla 1 se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente y los recogidos en bases de datos tales como la biblioteca espectral NIST (*National Institute of Standards and Technology*), especialmente indicada para la identificación de metabolitos analizados mediante GC-HRMS, u otras tales como *ChemSpider*, *Human Metabolome Data Base* (HMDB) o *Metlin*, empleadas para la identificación de metabolitos procedentes del análisis por UHPLC-HRMS. Atendiendo a *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) [9], se consiguió un nivel de confianza 2 de identificación (es decir, compuestos tentativamente anotados o estructuras probables) para todos los compuestos marcadores e incluso para algunos, se alcanzó el nivel 1 de confianza (estructura confirmada) por comparación con el correspondiente estándar analítico (ej. eugenol o trans-anetol).

Los marcadores seleccionados para la distinción de orígenes a partir del análisis por UHPLC-HRMS presentaron niveles relativos significativamente inferiores (p -valores $< 0,05$) en las muestras procedentes de Sri Lanka comparadas con los encontrados en las muestras de Brasil y Vietnam, cuyos contenidos fueron similares. Atendiendo a los marcadores elucidados mediante el análisis por GC-HRMS, los niveles relativos de ciertos metabolitos como dehidroabietal, fueron significativamente elevados en las muestras de Brasil mientras que las concentraciones de otros como proximadiol o cuminaldehído lo fueron en las muestras vietnamitas. En la Figura 4, a modo de ejemplo, se muestran los diagramas de caja que representan las concentraciones relativas para algunos de los marcadores seleccionados.

En cuanto al procesado de las muestras, en general, los marcadores elucidados tanto por GC-HRMS como por UHPLC-HRMS, se encontraron en las muestras sometidas a esterilización a concentraciones significativamente inferiores, revelando la posible pérdida de componentes volátiles (ej. eugenol) y más polares (ej. sitostenona) como una posible consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de esterilización (Figura 4). Tan solo las concentraciones del marcador 1-(*m*-metoxicinamoil)pirrolidina elucidado mediante GC-HRMS fueron mayores en las muestras esterilizadas (Figura 4).

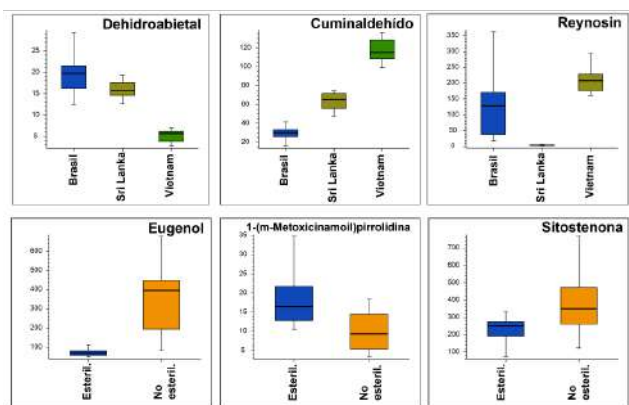


Figura 4. Diferencias en el contenido relativo de algunos marcadores atendiendo al origen geográfico o procesado.

Conclusiones

Este estudio muestra el gran potencial del análisis *fingerprinting* mediante la combinación de técnicas cromatográficas-espectrométricas y la metabolómica para la discriminación de pimienta negra de diferentes orígenes geográficos y procesados, constituyendo así una herramienta valiosa y robusta para asegurar la trazabilidad de la especia y luchar contra el creciente fraude alimentario.

Además, del estudio de posibles marcadores, se descubrió la notable influencia de la región geográfica de producción en la composición de la pimienta negra, por lo cual se obtiene una huella dactilar característica y distintiva, que se puede utilizar para la autenticación geográfica del producto. También se demostró que el

modo de procesado de las especias juega un papel importante, ya que los procesos de esterilización pueden producir pérdidas de algunos metabolitos, especialmente de aquellos más volátiles, así como el aumento de otros, debido a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso.

Agradecimientos

A.R.P. agradece la financiación proporcionada por la “Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU18/05133)” del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España. Los autores también agradecen a Sabater Spices (Murcia, España) por proporcionar las muestras utilizadas en este estudio.

Referencias

- [1] Zhang, C., Zhao, J., Famous, E., Pan, S., Peng, X., Tian, J., 2021. Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Food Chem.* 346, 128845.
- [2] Dosoky, N., Satyal, P., Barata, L., da Silva, J.K., Setzer, W., 2019. Volatiles of black pepper fruits (*Piper nigrum* L.). *Molecules* 24, 4244.
- [3] Heckert Bastos, L.P., Vicente, J., Corrêa dos Santos, C.H., Geraldo de Carvalho, M., Garcia-Rojas, E.E., 2020. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. *Food Hydrocoll.* 102, 105605.
- [4] Kharbach, M., Marmouzi, I., El Jemli, M., Bouklouze, A., Vander Heyden, Y., 2020. Recent advances in untargeted and targeted approaches applied in herbal-extracts and essential-oils fingerprinting - A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 177, 112849.
- [5] Farag, M.A., Hegazi, N., Dokhalahy, E., Khattab, A.R., 2020. Chemometrics based GC-MS aroma profiling for revealing freshness, origin and roasting indices in saffron spice and its adulteration. *Food Chem.* 331, 127358.
- [6] Mais, E., Alolga, R.N., Wang, S.L., Linus, L.O., Yin, X., Qi, L.W., 2018. A comparative UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics approach for distinguishing *Zingiber officinale* Roscoe of two geographical origins. *Food Chem.* 240, 239–244.
- [7] Rivera-Pérez, A., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2021. Feasibility of applying untargeted metabolomics with GC-Orbitrap-HRMS and chemometrics for authentication of black pepper (*Piper nigrum* L.) and identification of geographical and processing markers. *J. Agric. Food Chem.* 69, 5547–5558.
- [8] Rivera-Pérez, A., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2021. Application of an innovative metabolomics approach to discriminate geographical origin and processing of black pepper by untargeted UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS analysis and mid-level data fusion. *Food Res. Int.* 150, 110722.
- [9] Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098.