



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE
Capsicum chinense Jacquin (PIMENTA BODE-ROXO)**

Aguisson de Oliveira Salvi

Florianópolis
2015

Aguissson de Oliveira Salvi

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE
Capsicum chinense Jacquin (PIMENTA BODE-ROXO)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique
Reginatto

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Salvi, Aguisson de Oliveira

Caracterização fitoquímica e avaliação do potencial
antioxidante e antimicrobiano de Capsicum chinense Jacquin
(Pimenta-de-bode roxa) / Aguisson de Oliveira Salvi ;
orientador, Flávio Henrique Reginatto - Florianópolis, SC,
2015.

142 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Capsicum chinense Jacquin. 3.
Antocianinas. 4. Capsaicinoides. 5. Atividade
antioxidante. I. Reginatto, Flávio Henrique . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

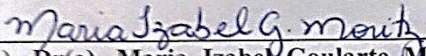
**“CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANO DE Capsicum chinense Jacquin.
(PIMENTA BODE-ROXO)”**

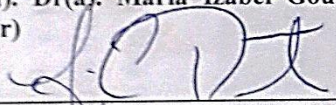
POR

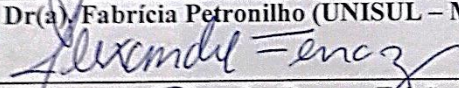
Aguisson de Oliveira Salvi

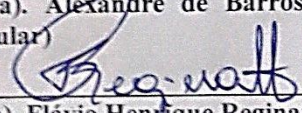
Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Maria Izabel Goularte Moritz (UFSC – Membro
Titular)


Prof(a). Dr(a). Fabricia Petronilho (UNISUL – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Alexandre de Barros Falcão Ferraz (ULBRA –
Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus pais Deoclécio e Maria Zeneide, a minha namorada Caroline Klein, ao meu irmão Jeferson e minha cunhada Jéssica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade, por me dar saúde e força nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Professor Flávio Henrique Reginatto, pela confiança, cumplicidade e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por todo o conhecimento o qual obtive durante o mestrado.

Agradeço à minha família, pai, mãe, irmão, namorada, cunhada, e em especial a minha sobrinha que chegou esse ano Maria Cecília, por todo o apoio incondicional, pois mesmo longe me auxiliaram e guiaram os meus caminhos.

Em especial à minha namorada Caroline, pelo amor, carinho e companheirismo, nos momentos mais difíceis. Agradeço também à sua família pela força e companheirismo: Euclides e Márcia Maranhão, Alexandre, Eveline, Adriane e Guilherme, e os pequenos sobrinhos que chegaram para alegrar essa família Arthur e Nicolas.

Aos meus amigos de Rondônia, os quais fizeram parte da minha jornada.

Agradeço aos meus amigos da graduação, Rubens, Geverson Marcos, Marcos Levi, Orlando, Vinicius, Robson Lorbieski, Laurien, Rafael Pitu, os quais estiveram caminhando desde o início da graduação, pelas histórias e parceria.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Carlos, Geison, Tatiana, Vitor, Simone, Caroline, Larissa, Solomon, Ana Cláudia, Pâmela, Luiza, Fernanda, Marci, Marlon, que me ajudaram e me auxiliaram quando precisei.

Ao professor José Cláudio Moreira do Laboratório de estresse oxidativo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela hospitalidade, e também aos seus alunos Rafael Bortolin, Karla Moresco e os demais colegas do laboratório, os quais me ajudaram no tempo em que passei em Porto Alegre.

Agradeço à “Claudinha”, técnica do laboratório por sempre ajudar nos momentos que necessitei.

Não há nada mais trágico neste mundo do que saber o que é certo e não fazê-lo. Que tal mudarmos o mundo começando por nós mesmos ? (Martin Luther King)

RESUMO

Capsicum chinense Jacq. é uma espécie proveniente da região tropical do continente americano, sendo domesticada pelos indígenas na bacia da região Amazônica. Os frutos são utilizados principalmente na forma *in natura* e apresentam uma diversidade de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos simples, os flavonoides e capsaicinoides. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil químico e o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos de *C. chinense* (Pimenta bode-roxo). Os resultados indicaram existir diferença significativa entre os teores de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais quando as mesmas estruturas do fruto (pericarpo, pedúnculo e semente) são submetidas a processos extrativos distintos. Os teores de fenólicos totais detectados no pericarpo, semente e pedúnculo foram, respectivamente, 53,51, 36,38 e 67,98 (EAG mg.g⁻¹) no processo por refluxo, e de 45,34, 39,8 e 62,19 (EAG mg.g⁻¹) no processo por ultrassom (Folin Ciocalteu). Para a técnica de Fast Blue BB, os teores de fenólicos totais detectados para o pericarpo, semente e pedúnculo foram, respectivamente, 22,42, 4,14, 23,17 (EAG mg.g⁻¹) no processo por refluxo e de, 14,87, 8,42, 23,72 (EAG mg.g⁻¹) por ultrassom. Os teores de flavonoides totais detectados para o pericarpo, semente e pedúnculo foram, respectivamente, 3,08, 6,26 e 7,11 (ER. mg.g⁻¹) no processo por refluxo e de, 2,26, 1,00 e 3,20 (ER. mg.g⁻¹) por ultrassom. Para antocianinas totais, os teores detectados na estrutura pericarpo foi de 5,22 AMT mg.g⁻¹ por refluxo, e 3,91 AMT mg.g⁻¹ por ultrassom. Em relação aos capsaicinoides, os teores detectados para as estruturas pericarpo e semente foram respectivamente, 2,90 e 2,71 mg.g⁻¹ para capsaicina e 0,25 e 0,30 mg.g⁻¹ para dihidrocapsaicina no processo por refluxo. Já os teores detectados de capsaicina nas estruturas pericarpo e semente foram, respectivamente 3,10 e 2,43 mg.g⁻¹ e 0,24 e 0,20 mg.g⁻¹ para dihidrocapsaicina no processo por ultrassom. As análises por LC-MS indicaram a presença das antocianinas delphinidina-3-*p*-cumaroilrutinosídeo-5-glicosídeo e pelargodina-3-sambubiosídeo. No que concerne à atividade antioxidante, as diferentes estruturas apresentaram a propriedade de captura dos radicais peroxilas, na técnica do TRAP, sendo possível estabelecer uma forte correlação ($r = 0,8935$) entre os teores de fenólicos e a técnica empregada. Na técnica do FRAP, os resultados indicaram poder antioxidante de redução do íon férrico à íon ferroso, para todas as estruturas, obtendo-se uma correlação significativa negativa ($r = -0,7300$) entre os teores dos compostos fenólicos das três estruturas e os resultados de FRAP. Os resultados

encontrados na avaliação da SOD demonstraram que apenas a estrutura pericarpo e pedúnculo apresentaram atividade de SOD, sendo possível obter correlação significativa forte negativa entre os teores de fenólicos ($r = 0,9971$) e flavonoides ($r = - 0,9914$) e a atividade da SOD. Na análise de captura do radical hidroxil, a estrutura do pericarpo apresentou a capacidade antioxidante mais promissora, e uma correlação forte entre os teores de flavonoides totais ($r = 0,8666$) e o método empregado. No ensaio de TBARS, os resultados indicaram existir atividade antioxidante frente à peroxidação lipídica, em todos os extratos analisados. Além disso, obteve-se uma correlação forte positiva ($r = 0,8867$) entre os teores de capsaicinoides e a técnica do TBARS. No ensaio de difusão em disco, todos os extratos avaliados não foram ativos frente às cepas testadas.

Palavras-chave: *Capsicum chinense* Jacq.; Compostos Fenólicos. Antocianinas. Capsaicinoides. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Phytochemical standardization and antioxidant and antimicrobial potential of *Capsicum chinense* Jacquin (Pimenta Bode-Roxo)

Capsicum chinense Jacq. is a specie from America tropical region, being domesticated by indigenous people of Amazon region. The fruits are mainly used *in natura*, and feature diversity of secondary metabolites, in particular simple phenolic compounds, flavonoids and capsaicinoids. This study aimed to evaluate the chemical profile, the antioxidant and antimicrobial potential of *C. chinense* Jacq. extracts (Pimenta bode-roxo). The results indicated significant differences among the content of phenolic compounds, total flavonoids and anthocyanins in these structures (pericarp, seed and stems) that were subjected to distinct extractive processes. The total phenolic content (Folin Ciocalteu) detected in the pericarp, seed and stems were respectively 53.51, 36.38 and 67.98 (GAE mg.g⁻¹) by reflux process, and 45.34, 39.8 and 62.19 (GAE mg.g⁻¹) in the ultrasound process. For Fast Blue BB assay, the total phenolic content detected for pericarp, seed and stems were respectively 22.42, 4.14, 23.17 (GAE mg.g⁻¹) by reflux process and, 14.87, 8.42, 23.72 (GAE mg.g⁻¹) by ultrasound process. The total flavonoid content observed for the pericarp, seed and stems were respectively 3.08, 6.26 and 7.11 (RE mg.g⁻¹) in the process reflux, and the 2.26, 1.00 and 3.20 (RE. mg.g⁻¹) by ultrasound process. To total anthocyanins, the content found in pericarp was 5.22 AMT mg.g⁻¹ for reflux, and 3.91 AMT mg.g⁻¹ by ultrasound. Concerning the capsaicinoids, the content found for pericarp and seeds were, respectively, 2.90 and 2.71 mg.g⁻¹ for capsaicin, 0.25 and 0.30 mg.g⁻¹ for dihydrocapsaicin considering reflux process. Furthermore the capsaicin content of pericarp and seed were respectively 3.10 and 2.43 mg.g⁻¹ and 0.24 and 0.20 mg.g⁻¹ to dihidrocapsaicin in ultrasound process. The analysis by LC-MS indicated the presence of anthocyanins delphinidin-3-*p*-coumaroilrutinoside-5-glucoside and pelargonidin-3-sambubioside. Regarding to antioxidant activity, the different structures showed scavenger property of peroxy radicals by TRAP, and was possible to establish a strong correlation ($r = 0.8935$) between phenolic content and the values of TAR. In FRAP assay, the results indicated antioxidant power reduction of ferric ion to ferrous ion, for all structures, resulting in a negative correlation ($r = -0.7300$) between phenolic compounds content of the three structures and the FRAP results. The SOD results showed that only pericarp and stem presented

antioxidant activity, being possible to obtain a strong negative correlation between phenolic ($r = - 0.9971$) and flavonoids ($r = - 0.9914$) content with SOD values. The hydroxyl radical scavenger analysis, the most promising antioxidant capacity was observed to pericarp, presented a strong correlation ($r = 0.8666$) with total flavonoid content. The TBARS assay showed to all analyzed extracts antioxidant activity against the lipid peroxidation, in addition, was observed a strong positive correlation ($r = 0.8867$) between the capsaicinoids content with TBARS. All extracts evaluated, in the disk diffusion assay, were not active against the strains evaluated.

Keywords: *Capsicum chinense* Jacq.; Phenolic compounds. Anthocyanins. Capsaicinoids. Antioxidant activity. Antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécies domesticadas e consumidas no Brasil.....	35
Figura 2 – Morfotipo Pimenta bode-roxo (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).....	41
Figura 3 – Estruturas químicas dos principais Flavonoides descritos em pimentas do gênero <i>Capsicum</i> sp.....	42
Figura 4 – Estrutura química da antocianidina e seus substituintes.....	44
Figura 5 – Esquema estrutural de interconversão das Formas de antocianinas pH dependentes.....	46
Figura 6 – Estruturas químicas dos principais constituintes dos capsaicinoides. (I) Capsaicinoides (R= Cadeia carbônica alifática); (II) Capsaicina; (III) Dihidrocapsaicina.....	49
Figura 7 – Divisão das estruturas do fruto da variedade pimenta bode-roxo (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).....	51
Figura 8 – Reação de Fenton.....	53
Figura 9 – Mecanismos de formação de espécies reativas de oxigênio a partir da redução mono eletrônica de O ₂ e os diversificados mecanismos de defesa antioxidante.....	55

Figura 10 – TFT realizado pela técnica de Folin-Ciocalteu Estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos (Teste T não pareado).....	71
Figura 11 – Acoplamento entre um ácido gálico e o sal de diazônio <i>Fast Blue BB</i>	73
Figura 12 – TFT realizado pela técnica de Fast Blue BB. Estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos. (Teste T não pareado).....	74
Figura 13 – Correlação de Pearson entre os teores de compostos fenólicos totais, pelas técnicas de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB ($r = 0,9160$, $p < 0,0001$).....	75
Figura 14 – Doseamento da capsaicina nas técnicas de Folin Ciocalteu e Fast Blue BB.....	75
Figura 15 – Esquema geral da complexação de flavonoides com o íon Al^{3+}	76
Figura 16 – FT realizado pela técnica com reagente de complexação. Estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos. (Teste T não pareado).....	77
Figura 17 – Correlação de Pearson entre os teores de TFT e FT de ambos os extratos, pelas técnicas de Folin Ciocalteu e Flavonoides Totais com agente de complexação ($r = 0,9652$; $p < 0,0001$).....	78

Figura 18 – Correlação de Pearson entre os teores de TFT e FT de ambos os extratos, pelas técnicas de Fast Blue BB e Flavonoides Totais com agente de complexação ($r = 0,9652$; $p < 0,0001$).....	78
Figura 19 – Teor de antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial por refluxo e ultrassom. Valor de p indica entre as estruturas indica diferença significativa (Teste T não pareado).....	80
Figura 20 – Cromatograma representativo de ambos extratos metólicos do pericarpo de <i>C chinense</i> Jacq.....	82
Figura 21 – Espectro de massas por ESI (+) obtido do íon molecular de massa m/z 919.2490 dos extratos metanólicos de <i>C.chinense</i> Jacq.....	83
Figura 22 – Espectro de massas por ESI (+) obtido do íon molecular de massa m/z 545,1672 dos extratos metanólicos de <i>C.chinense</i> Jacq.....	83
Figura 23 – Estrutura da antocianina majoritária e seus fragmentos nos extratos de <i>C.chinense</i> Jacq. obtido por LC-MS ionização por <i>electrosrapay</i>	85
Figura 24 – Estrutura química peonidina-3 sambubiosídeo e o núcleo fundamental.....	88
Figura 25 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por refluxo da estrutura pericarpo de <i>C. chinense</i> Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280 nm	89

Figura 26 – Cromatograma obtido do extrato Metanólico por refluxo da estrutura semente de <i>C. chinense</i> Jacq. por CLAE/UV-Viscom detecção por 280nm	89
Figura 27 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por ultrassom da estrutura pericarpo de <i>C. chinense</i> Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280nm	90
Figura 28 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por ultrassom da estrutura semente de <i>C. chinense</i> Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280nm	90
Figura 29 – Gráfico demonstrando o teor relativo de cada capsaicinoide presente no extrato obtido por refluxo no pericarpo e semente de <i>C. chinense</i> Jacq (Teste T não pareado).....	91
Figura 30 – Gráfico demonstrando o teor relativo de cada capsaicinoide presente no extrato obtido por ultrassom no pericarpo e semente de <i>C. chinense</i> Jacq.....	92
Figura 31 – Termólise da estrutura química do AAPH, gerando dois radicais alquil nitrogênio.....	95
Figura 32 – Valores do potencial antioxidante reativo total (TRAP) foram plotados no gráfico em valores de AUC. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado).....	95
Figura 33 – Valores da perda inicial de quimiluminescência (TAR), expressos em Io/I. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado).....	97

Figura 34 – Reação de transferência de elétrons por agente redutor (antioxidante).....	98
Figura 35 – Resultados obtidos dos extratos Metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie <i>C.chinense</i> Jacq para o método do FRAP. Valor de p indica diferença significativa. (Teste T não pareado).....	99
Figura 36 – Resultados obtidos dos extratos Metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie <i>C.chinense</i> Jacq. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado).....	102
Figura 37 – Degradação da deoxiribose a partir da reação de Fenton.....	103
Figura 38 – Resultados obtidos dos extratos metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie <i>C.chinense</i> Jacq para técnica de captura do radical hidroxil. Valor de p não indicou diferença significativa (Teste T não pareado).....	104
Figura 39 – Resultados obtidos dos extratos Metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie <i>C.chinense</i> Jacq para técnica do TBARS. Valor de p indica diferença Significativa Teste T não pareado).....	106
Figura 40 – Resumo dos resultados encontrados na determinação do perfil antioxidante <i>in vitro</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de capsaicina e dihidrocapsaicina por CLAE nas estruturas do pericarpo e semente.....	91
Tabela 2 – Resultados dos teores em mg.g^{-1} encontrados na avaliação do perfil químico nos extratos metanólicos obtidos por refluxo e ultrassom.....	94
Tabela 3 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre TAR e os teores de fenólicos, flavonoides totais, capsaicina e dihidrocapsaicina totais dos extratos das três estruturas de <i>C. chinense</i> Jacq.....	98
Tabela 4 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método FRAP e fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais dos extratos das três estruturas de <i>C. chinense</i> Jacq.....	101
Tabela 5 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método SOD e fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais dos extratos das três estruturas de <i>C. chinense</i> Jacq.....	103
Tabela 6 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método Captura do radical hidroxil e os teores de compostos fenólicos, flavonoides totais dos extratos das três estruturas de <i>C. chinense</i> Jacq....	105
Tabela 7 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método TBARS e fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais dos extratos das três estruturas de <i>C. chinense</i> Jacq.....	107
Tabela 8 - Resultados da Atividade antibacteriana de extrato de metanólico de sementes, pericarpo e pedúnculo de <i>C. Chinense</i> Jacq.....	108

Tabela 9 - Resultados da Atividade antifúngica de extrato de metanólico de sementes, pericarpo e pedúnculo de <i>C.Chinense</i> Jaç.....	109
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH - 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hidrocloreto
Al³⁺ - Cátion alumínio (III)
AM – Absorbância molar
AMT – Antocianinas monoméricas totais
AOAC – Association of Analytical Communities
AUC –Área sob a curva
CAT – Catalase
CuZnSOD – Superóxido dismutase contendo cobre e zinco
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute
DAD – Detector por arranjos de diodos
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EAC – Equivalentes de ácido clorogênico
EAG – Equivalentes de ácido gálico
ED – Equivalente de delfinidina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo
EQ – Equivalentes de quercetina
ER – Equivalente de rutina
ES – Extrato seco
ESI-MS – Espectrometria de massa com ionização por *electrospray*
EROS – Espécies reativos de oxigênio
FD – Fator de diluição
FRAP - Poder antioxidante de redução do íon férrico
Fe (TPTZ)₂³ - íon férrico -2,4,6-tripiridiltriaquina
Fe²⁺ - Íon ferroso
Fe³⁺ - Íon férrico
GSH – Glutathione reduzida
GSHPx - glutathionperoxidase
L - Caminho ótico
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-HRMS – Cromatografia líquida de alta resolução
MDA – Malondialdeído
MnSOD – Superóxido dismutase contendo manganês
MM – Massa molar
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT - Azul de Nitrotetrazólio
QTOF – Quadrupolo com “tempo de voo”
TAR- Reatividade antioxidante total
TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
TF – Teor de flavonoides totais
TFT – Teor de fenólicos totais
TRAP – Potencial antioxidante reativo total
SOD – Superóxido dismutase
SF – Sulfato ferroso
UFC- Unidades formadora de colônia
UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-Vis - Ultravioleta - Visível
2-DR - 2-desoxirribose
 ϵ - coeficiente de absorvidade molar

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
3.1	GÊNERO <i>CAPSICUM</i>	35
3.1.1	Origem, aspectos botânicos e distribuição geográfica.....	35
3.1.2	Diversidade genética.....	36
3.1.3	Cultivo e aspectos econômicos.....	37
3.1.4	Utilização e comercialização.....	38
3.2	<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.....	39
3.2.1	Origem e distribuição.....	39
3.2.2	Aspectos botânicos e domesticação.....	39
3.2.3	Morfotipo Pimenta bode.....	40
3.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM <i>CAPSICUM</i>	41
3.3.1	Compostos fenólicos.....	41
3.3.2.	Flavonoides.....	42
3.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ. (PIMENTA BODE-ROXO).....	43
3.4.1	Antocianinas.....	43
3.4.1.1	Aspectos químicos.....	43
3.4.1.2	Métodos de extração.....	47
3.4.1.3	Métodos de caracterização de antocianinas....	48
3.4.1.3.1	<i>Espectrometria UV/Vis</i>	48
3.4.1.3.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/DAD</i>	49
3.4.1.3.3	<i>Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas</i>	49
3.4.2	Capsaicinoides.....	49
3.4.2.1	Capsaicina.....	51
3.4.2.1.1	<i>Distribuição da capsaicina nos frutos</i>	52
3.5	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO <i>CAPSICUM</i>	52
3.5.1	Atividade antioxidante.....	52
3.5.1.1	Radicais livres.....	52

3.5.1.2	Antioxidantes e Estresse Oxidativo.....	54
3.5.1.3	Estresse oxidativo em lipídios.....	55
3.5.1.4	Atividade antioxidante no gênero <i>Capsicum</i>	56
3.5.2	Atividade antimicrobiana.....	57
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	59
4.2	PROCESSO EXTRATIVO.....	59
4.3	ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT).....	59
4.3.1	Folin Ciocalteu.....	59
4.3.2	Fast Blue BB.....	60
4.4.	ANÁLISE DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS (FT).....	60
4.5	ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS.....	61
4.5.1	Método pH diferencial.....	61
4.6	ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (Q-Tof).	61
4.7	ANÁLISE DOS TEORES DE CAPSAICINA E DIHIDROCAPSAICINA.....	62
4.8	DETERMINAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	63
4.8.1	Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP).....	63
4.8.2	Determinação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP)	63
4.8.3	Avaliação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) via redução do azul de Nitrotetrazólio (NBT).....	64
4.8.4	Avaliação da capacidade de captura do radical hidroxil (\cdotOH)	64
4.8.5	Avaliação da peroxidação lipídica pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	65

4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS EXTRATOS OBTIDOS POR REFLUXO DAS DIFERENTES PARTES DOS FRUTO DE <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	66
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1	AVALIAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO.....	69
5.2	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NAS DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE <i>C. chinense</i> JACQ.....	69
5.2.1	Método de Folin Ciocalteu.....	70
5.2.2	Método de Fast Blue BB.....	72
5.2.3	Comparação dos TFT pelas técnicas de Folin Ciocalteu e Fast Blue BB.....	74
5.3	TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS NAS DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE <i>C.</i> <i>CHINENSE</i> JACQ.....	76
5.3.1	Comparação dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais.....	78
5.4	TEOR DE ANTOCIANINAS NA ESTRUTURA PERICARPO DE <i>C.</i> <i>CHINENSE</i> JACQ.....	79
5.5	IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (Q-TOF)	81
5.6	TEORES DE CAPSAICINA E DIHIDROCAPSAICINA NO PERICARPO E SEMENTE DE <i>C. CHINENSE</i> JACQ.....	88
5.7	DETERMINAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	94
5.7.1	Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP).....	94
5.7.2	Determinação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP).....	98
5.7.3	Avaliação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) via redução do Nítotetrazólio (NBT).....	101

5.7.4	Avaliação da capacidade de captura do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$).....	103
5.7.5	Avaliação da peroxidação lipídica pela produção de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	105
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA.....	108
6	CONCLUSÕES.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113

1 APRESENTAÇÃO

Pimentas do gênero *Capsicum* são conhecidas desde o início da civilização constituindo parte da alimentação de diversas populações. Além da ampla utilização na culinária e como ornamental, também tem sido descrito o emprego de pimentas na medicina popular com ação analgésica, antisséptica, tônica entre outras (BOSLAND; VOTAVA, 2000). Outras aplicações na medicina popular são para o tratamento de artrites, reumatismo, erupções cutâneas, feridas e picadas de animais (MEGHVANSI et al, 2010; VAN WYK; WINK, 2004).

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e é constituído por cerca de 35 espécies, das quais, cinco são domesticadas (BARBOZA; BIANCHETTI; LAMMERS, 2005; CARRIZO et al., 2013; CARVALHO; BIANCHETTI, 2007). Dentre as cinco espécies domesticadas, quatro são cultivadas e consumidas no Brasil: *C. annum* L., *C. frutescens*, *C. baccatum* L e *C. chinense* Jacquin. (LANNES et al., 2007). A espécie *C. chinense* Jacquin, objeto de investigação do presente trabalho, destaca-se no Brasil pelo amplo cultivo na região Centro Oeste e é reconhecida por apresentar diferentes variedades: “De cheiro”, “Cumari do Pará”, “Biquinho”, “Murupi” e “Bode” (RIBEIRO et al., 2007). Em relação aos frutos, esses podem variar desde a cor verde (imaturos) até amarelo, vermelho ou roxo (maduros), apresentando uma alta pungência e intenso aroma (EMBRAPA, 2015; RIBEIRO, 2007).

Devido ao amplo consumo dos frutos de espécies do gênero *Capsicum* sp. no Brasil, torna-se relevante o conhecimento dos seus constituintes químicos e a relação desta composição com as propriedades biológicas. Sabe-se, por exemplo, que os frutos destas espécies possuem um importante papel na atividade antioxidante (HERVERT-HERNANDEZ et al., 2010), propriedade esta, relacionada com a presença de compostos como antocianinas (SADILOVA; FLORIAN; STINTZING, 2006), capsaicinoides (KIRSCHBAUM-TITZE et al., 2002; OCHI et al., 2003; PINO et al., 2007) e os compostos fenólicos (HOWARD et al., 2000; MARIN et al., 2004; MATERSKA E PERUCKA, 2005).

Considerando o pouco conhecimento da composição química e propriedades biológicas de *C. chinense* Jacq., o presente trabalho tem como objetivo principal a investigação da composição química, com ênfase nos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais e capsaicinoides, além da identificação de antocianinas presentes nos frutos de *C. chinense*. Adicionalmente, o

trabalho descreve a correlação dos compostos citados com a capacidade antioxidante e antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico e o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos de *Capsicum chinense* Jacq. (Pimenta bode-roxo).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os rendimentos dos extratos das diferentes partes do fruto de *Capsicum chinense* Jacq. (pericarpo, semente e pedúnculo) por refluxo e ultrassom;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais por meio dos métodos de Folin-Ciocalteu e FAST-BLUE BB nos extratos obtidos;
- Determinar, para os extratos obtidos, o teor de flavonoides totais por método colorimétrico;
- Determinar o teor de antocianinas monoméricas totais por meio do método do pH diferencial;
- Determinar o teor capsaicina e dihidrocapsaicina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas diferentes partes do fruto (pericarpo, sementes) de *C. chinense* Jacq.;
- Identificar as antocianinas majoritárias presentes nos extratos por cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (LC-HRMS);
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *C. chinense* por meio das técnicas do potencial antioxidante reativo total (TRAP), poder de redução do íon férrico (FRAP), Captura do radical hidroxil, atividade da superóxido dismutase (SOD-LIKE) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar a potencial atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos pelo ensaio de difusão em disco.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÊNERO *CAPSICUM*

3.1.1 Origem, aspectos botânicos e distribuição geográfica

As espécies do gênero *Capsicum* são plantas nativas da América tropical e subtropical (REIFSCHNEIDER, 2000). Os registros mais antigos do consumo de pimentas datam aproximadamente 7.000 a.C na região de Tehuacán, no México (REIFSCHNEIDER, 2000). No entanto, o conhecimento a respeito do cultivo e utilização de pimentas do gênero *Capsicum* por civilizações pré-colombianas é limitado, uma vez que existem poucas informações sobre a natureza, dimensão, estrutura e tempo de uso de pimentas do gênero (POWIS et al., 2013).

A utilização de pimentas como fonte alimentícia difundiu-se por toda a Europa e Ásia, a partir das grandes navegações entre os séculos XV-XVI (POWIS et al., 2013; REIFSCHNEIDER, 2000). Os europeus denominaram os “novos” frutos encontrados como pimentas, pois apresentavam gosto quente e picante, ao contrário de qualquer outro fruto encontrado na Europa (BOSLAND, 1996; ESHBAUGH, 1993; HEISER, 1976).

No Brasil, quatro das cinco espécies domesticadas são cultivadas e consumidas: *C. annum* L. (‘pimentão’, ‘pimenta doce’), *C. baccatum* L. (‘dedo-de-moça’, ‘chapéu-de-bispo’), *C. frutescens* L. (‘pimenta malagueta’) e *C. chinense* Jacquin. ‘pimenta-de-cheiro’, ‘cumari-do-pará’, ‘pimenta bode’ (Figura 1) (BARBOZA; BIANCHETTI; LAMMERS, 2005; CARRIZO et al., 2013; CARVALHO; BIANCHETTI, 2007; PICKERSGILL, 1997). As referidas espécies podem apresentar diferentes variedades botânicas ou grupos varietais. As pimentas ‘dedo-de-moça’ e ‘chapéu-de-bispo’, por exemplo, são variedades da espécie *C. baccatum* L. (RIBEIRO et al., 2007) e possuem formato e coloração distintos.

Figura 1- Espécies domesticadas e consumidas no Brasil.



C. baccatum L.

C. baccatum L.

*C. frutescens* L.*C. chinense* Jacq.*C. chinense* Jacq.

Fonte: Embrapa (2015).

Os taxonomistas realizam a identificação das espécies examinando principalmente as flores. Estas são hermafroditas e possuem geralmente o cálice com 5 sépalas e a corola com 5 pétalas. Outras características como o número de flores por nó, posição da flor e do pedicelo, coloração da corola e antera, presença ou ausências de manchas nos lobos das pétalas e margem do cálice, também permitem identificar as principais espécies domesticadas (CARVALHO; BIANCHETTI, 2007).

Em relação ao sistema reprodutivo do gênero *Capsicum*, o mesmo é definido como autógama, uma vez que o pólen e o óvulo estão localizados em uma mesma flor, facilitando a reprodução das espécies (CARVALHO; BIANCHETTI, 2007; REIFSCHNEIDER, 2000). Os frutos são definidos como baga, podendo apresentar estrutura oca e diferentes formas, como de uma cápsula. Além disso, a variabilidade morfológica favorece o aparecimento de frutos com diferentes tamanhos, formas, colorações e grau de pungência. A característica de pungência é restrita ao gênero *Capsicum*, sendo atribuída principalmente ao composto capsaicina, a qual é liberada quando o fruto sofre algum dano físico. A pungência pode ser medida em *Unidades de Calor Scoville* (SHU) através de aparelhos específicos. Esse valor varia de zero (pimentas doces) e pode chegar a 300,00, como no caso de algumas variedades picantes como ‘aji’, ‘páprica’ e ‘chilies’ (CARVALHO; BIANCHETTI, 2007).

3.1.2 Diversidade genética

A diversidade de formas, tamanhos e cores dos frutos das espécies do gênero *Capsicum* está relacionada à variabilidade genética dessas plantas, o que permite a busca de novos tipos com variabilidade morfológica (NEITZKE et al., 2014; RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008). Tal fato é relevante, uma vez que, o desenvolvimento de novos

morfotipos de pimentas permite a expansão do cultivo em diferentes regiões, e ainda favorece o mercado da indústria alimentícia e farmacêutica para posterior desenvolvimento de novos produtos (POZZOBON et al., 2015). Além disso, o melhoramento de plantas também visa o controle de pragas e doenças, as quais acometem parte das espécies (SOUZA, 2008).

Nos últimos anos, as pesquisas cresceram no intuito de obter novas coleções de acessos em banco de germoplasma para o referido gênero. Neste caso, o termo acesso pode ser definido como os diferentes morfotipos de uma determinada espécie a qual foi depositada em banco de germoplasma (NETTO, 2010). Este por sua vez, consiste em unidades conservadoras de material genético que utilizam os acessos com a finalidade de preservar, melhorar ou desenvolver novos morfotipos (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2013). Sabe-se que o banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças possui atualmente cerca de 2500 acessos de pimentas e pimentões. Nesse instituto, os estudos buscam identificar possíveis acessos duplicados na coleção, além promover a caracterização morfológica, citogenética e molecular das espécies (SILVA, 2008). Atualmente, destacam-se nacionalmente os Bancos de Germoplasma localizados nas cidades de Brasília-DF (BAG - Embrapa Hortaliças), Campinas-SP (BAG - IAC) e Viçosa-MG (BAG-UFV).

3.1.3 Cultivo e aspectos econômicos

O cultivo e produção de pimentas do gênero *Capsicum* cresceu nos últimos anos devido ao aumento do consumo mundial (TRADE INFORMATION BRIEF, 2005). De acordo com dados estimados pela FAO (2012), a produção chegaria a 31,2 milhões de toneladas no ano de 2013, e dentre os maiores produtores mundiais de pimentas, destacam-se os países do continente asiático.

No Brasil, o cultivo de pimentas ganhou notoriedade nos últimos anos em todo território, com destaque para os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2008). O cultivo é realizado por pequenos, médios e grandes produtores de maneira individual ou de forma integrada a agroindústria (FURTADO; DUTRA; DELIZA, 2006; RIBEIRO et al., 2007).

Os valores reais de produção e comercialização de pimentas no Brasil são limitados e a informação disponível não reflete a realidade econômica para essa hortaliça, uma vez que a grande parte da produção nacional é comercializada em mercados regionais e locais, não

contribuindo para os valores estatísticos reais (DOMENICO; LILLI; MELO, 2010). No entanto, dados de 2007 indicaram que a área disponível para o cultivo de pimentas atingiu cerca de cinco mil hectares e a produção média variou entre 10-30 toneladas por hectare (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2008). Tal fato está relacionado com o tipo de pimenta cultivada, tratos culturais, clima e nível de tecnologia adotado (GENUNCIO; ZONTA; NASCIMENTO, 2015). No mesmo período, o crescente consumo de pimentas no mercado interno chegou a 80 milhões de reais ao ano e isso proporcionou o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2008).

Atualmente, estima-se que a produtividade nacional média de pimentas esteja entre 10 a 45 toneladas por hectare ao ano (com média mundial de 15,8 toneladas/hectares). Podem-se citar alguns exemplos de produtividade, no qual se destaca a pimenta ‘malagueta’, chegando a uma produção de 10 toneladas/hectare, sendo esta a variedade mais cultivada no Brasil. Para as pimentas ‘biquinho’ e ‘bode’ a produção média encontra-se em torno de 20 toneladas/hectare (GENUNCIO; ZONTA; NASCIMENTO, 2015).

3.1.4 Utilização e comercialização

A maior parte do consumo de pimentas ocorre na forma *in natura*. Esse consumo é influenciado pelos hábitos alimentares de cada região. Na região Sul do país, o consumo de pimentas na forma de fruto fresco é menos comum, optando-se pelo consumo na forma processada. Entretanto, na região Centro-Oeste, as pimentas são consumidas *in natura*, destacando-se ‘malagueta’, ‘de cheiro’, ‘dedo-de-moça’ e ‘bode’ (RIBEIRO et al., 2007).

Nos últimos anos houve uma elevação no processamento de pimentas por alguns ramos da indústria (RIBEIRO; HENZ, 2007; RIBEIRO et al., 2007). Na indústria alimentícia, por exemplo, utilizam-se pimentas doces ou picantes sendo processadas nas formas de geléias, pó, molhos líquidos, entre outros. Esse processamento ganhou destaque, uma vez que as pimentas podem ser utilizadas de três formas: flavorizantes, corantes e pimentas picantes. Por outro lado, na indústria farmacêutica e de cosméticos as pimentas picantes ganham destaque e são empregadas principalmente na composição de pomadas para artrite e artrose. (RIBEIRO; HENZ, 2007).

Além disso, também é descrito na literatura o emprego de pimentas na medicina popular devido às propriedades terapêuticas já conhecidas (BOSLAND; VOTAVA, 2000; RIBEIRO; HENZ, 2007).

Dentre as aplicações na medicina popular, destaca-se o emprego de pimentas do gênero *Capsicum* no tratamento da dor de estômago, reumatismo, tratamento de artrites, erupções cutâneas, feridas, entre outras (MEGHVANSI et al., 2010; VAN WYK; WINK, 2004).

A comercialização de pimentas é algo bastante atrativo atualmente, e está relacionada ao tipo, quantidade e preço final. Grande parte das pimentas comercializadas na forma de fruto fresco podem ser encontradas em grandes centros de comércio como os CEASAs. Tal tipo de comércio organiza e promove a distribuição para o setor de varejo, indústrias e também restaurantes. Na cidade de Goiânia, por exemplo, a CEASA promove a individualização de todos os tipos de pimentas, fazendo cotações dos preços de forma separada, uma vez que as pimentas são de grande importância para toda a região. Neste local, pimentas como a ‘malagueta e ‘bode roxo ou roxa’ são bem distribuídas e comercializadas (RIBEIRO et al., 2007).

3.2 *CAPSICUM CHINENSE* JACQ.

3.2.1 Origem e distribuição

A espécie *C. chinense* Jacquin foi descrita pela primeira vez em 1776 pelo botânico Nikolaus Joseph von Jacquin (ANDREWS, 1984; BOSLAND; VOTAVA, 2012). A denominação “*chinense*” advém da China e se tornou uma designação incorreta na época, já que a espécie era proveniente das Américas. (REIFSCHNEIDER, 2000). Até os dias atuais, a referida espécie é amplamente conhecida na região Tropical do continente Americano e é utilizada como tempero principalmente na culinária da região do Caribe (MOSES; UMAHARAN, 2012).

No Brasil, a espécie foi domesticada pelos indígenas na região da Bacia Amazônica, sendo caracterizada como a mais brasileira das espécies domesticadas (CASALI; COUTO, 1984; REIFSCHNEIDER, 2000).

C. chinense Jacq. apresenta algumas variedades como a pimenta “Habanero”, popularmente conhecida no México (RIBEIRO et al, 2007), e as variedades “de cheiro”, “biquinho”, “murupi”, “cumari-do-Pará” e “bode” popularmente utilizadas no Brasil (REIFSCHNEIDER, 2000; RIBEIRO et al., 2007).

3.2.2 Aspectos botânicos e domesticação

C. chinense Jacq. é uma planta arbustiva que possui entre 1,5 à 2,5 metros de altura. Quanto à morfologia, as folhas e caules caracterizam-se por serem glabros e com rara pubescência. As folhas podem ser ovadas ou ovado-lanceolados com tamanho de 10,5 cm,

largas, lisas ou rugosas, com tonalidade desde o verde claro até o escuro (SMITH; HEISER, 1957). As flores apresentam-se de duas a cinco por nó, com exceção de flores deupeperadas; o pedicelo é declinado, raramente ereto, relativamente curto e grosso na antese; o cálice não apresenta dentes com forte constrição na base; a corola pode ser branca esverdeada sem mancha ou verde-amarelada, medindo de 0,5 a 1,0 cm de comprimento; as anteras são geralmente azuis, roxas, violetas ou amarelas púrpuras ou amareladas (EMBRAPA, 2015; SMITH; HEISER, 1957). Os frutos podem ter a forma esférica ou alongada, lisos ou enrugados, medindo de 1,0 a 12,0 centímetros de comprimento (SMITH; HEISER, 1957).

A domesticação da espécie *C. chinense* Jacq. possibilitou o aparecimento de frutos com uma diversidade de tamanhos, formas e cores, os quais apresentam pungência e aroma característico (LANNES et al., 2007). Nesse contexto, alguns morfotipos como as pimentas ‘murupi’, ‘habanero’ e ‘bode’ podem favorecer a exploração de novas formas domesticadas, de maneira a selecionar novos genótipos, os quais podem ser incorporados em banco de germoplasma (POZZOBON et al., 2015). Além disso, o desenvolvimento de novos morfotipos de pimentas contribui para o controle de doenças, e aumento da produtividade agrícola (CARVALHO, S.; BIANCHETTI; HENZ, 2003; RIBEIRO et al., 2003).

A espécie *C. chinense* Jacq. possui mais de 95 acessos no banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa. O depósito em banco de germoplasma favorece o melhoramento genético desta espécie, uma vez que o conhecimento sobre as diversas características, como, aspectos morfológicos, reprodutivos e bioquímicos viabilizam o aparecimento de novas cultivares (LANNES, 2005).

3.2.3 Morfotipo Pimenta bode

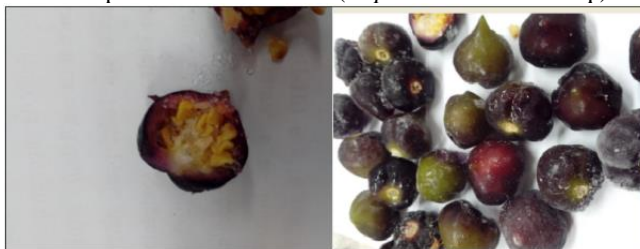
Como descrito anteriormente, *C. chinense* Jacq. apresenta uma diversidade de frutos com diferentes tamanhos, cores, e formas. (POZZOBON et al., 2015; RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008).

A pimenta bode ou de-bode é um morfotipo muito utilizado na região Centro-Oeste do Brasil, sendo comercializada principalmente em grandes centros de comércio. Na cidade de Goiânia, por exemplo, essa variedade é comercializada na CEASA, sendo adquirida principalmente na forma de fruto fresco, uma vez que é utilizada em condimentos, e também para a fabricação de conservas (RIBEIRO et al., 2007).

O referido morfotipo possui forma arredondada ou achatada lembrando “uma pitanga”. Os mesmos possuem posição pendente em

relação ao pedúnculo. O tamanho pode variar entre um centímetro de comprimento por um centímetro de largura; a cor dos frutos pode variar desde verde (imaturos) até amarelo, vermelho ou roxo (maduros); apresentam uma alta pungência e um intenso aroma (EMBRAPA, 2015; RIBEIRO et al., 2007). O fruto roxo é conhecido popularmente como pimenta bode ou de-bode (Figura 2).

Figura 2 - Morfotipo Pimenta bode-roxo (*Capsicum chinense* Jacq.)



Fonte: Autor (2015)

3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CAPSICUM

Diversas classes de metabólitos secundários são descritos na literatura para o gênero *Capsicum*, destacando-se os compostos fenólicos simples (MELLO et al., 2011; MENICHINI et al., 2009. MORESCO, 2013), os capsaicinoides (KEHIE; KUMARIA; TANDON, 2013; LOIZZO et al, 2015; MORESCO, 2013), os flavonoides (HOWARD et al., 2000; MAHDAVIAM; GHORBANLI; KALANTARI, 2008) e as antocianinas (CHAIM et al, 2003; VOTAVA; BOSLAND, 2004) dentre outros.

3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como uma classe de metabólitos secundários que apresentam pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático (VERMERRIES; NICHOLSON, 2006). O padrão de substituição no anel aromático depende da origem biogenética, sendo proveniente de duas vias de formação: via do ácido chiquímico a partir de carboidratos ou via do acetato-polimalato, que se inicia com acetil coenzima A e malonil coenzima A (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Somado a isso, os fenólicos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono na molécula (HARBONE; SIMMONDS, 1964).

Nos últimos anos, os compostos fenólicos estão sendo pesquisados em pimentas do gênero *Capsicum*, devido às propriedades

farmacológicas dos frutos, principalmente pela atividade antioxidante e antimicrobiana (CICHEWICZ; THORPE, 1996; MATERSKA; PERUCKA, 2005; KAPPEL, 2007)

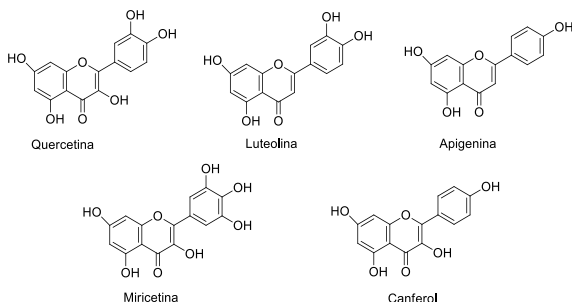
3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são um subgrupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes compostos apresentam uma variedade de funções destacando-se fatores relacionados ao estresse abióticos como a radiação UV-B (HARBORNE; WILLIAMS, 2000) e também na defesa contra herbívoros e agentes patogênicos. Ademais, os flavonoides estão relacionados com a função de interação alelopáticas entre espécies vegetais (GOULD; LISTER, 2006).

Os flavonoides são biossintetizados pela condensação do *p*-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA, sendo reação catalisada pela enzima chalcona sintetase. A estrutura fundamental básica-b2-fenilcromano é posteriormente submetida a sucessivas reações, originando as diferentes classes de flavonoides (VERMERRIS, WILFRED.; NICHOLSON, RALPH, 2006). De maneira geral apresentam-se conjugados com açúcares (heterosídeos) e oxigenados.

Dentre as principais classes de flavonoides de interesse farmacêutico destacam-se: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Os principais flavonoides descritos em frutos do gênero *Capsicum* sp. são a quercetina, luteolina, apigenina, miricetina e canferol (Figura 3), ocorrendo variações de derivados glicosilados destas agliconas (BAE et al., 2012; MARÍN et al., 2004; MATERSKA; PERUCKA, 2005; MATERSKA et al., 2003)

Figura 3 - Estruturas químicas dos principais flavonoides descritos em pimentas do gênero *Capsicum* sp.



Fonte: Autor (2015)

3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *CAPSICUM CHINENSE* JACQ. (PIMENTA BODE-ROXO)

Os metabólitos secundários de *C. chinense* Jacq. estudados no presente trabalho são comumente descritos na espécie. Contudo deve-se salientar que *C. chinense* apresenta diversas variedades ou cultivares, o que favorece o aparecimento de diferentes teores dos compostos estudados. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, apenas relatam os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, em especial as antocianinas, o que dificulta uma avaliação sobre quais os demais compostos podem estar presentes na espécie (MENICHINI et al., 2009; MONFORTE-GONZÁLEZ, 2010). Em relação aos capsaicinoides, os principais compostos encontrados na espécie são a capsaicina e dihidrocapsaicina (MENICHINI et al., 2009; MONFORTE-GONZÁLEZ, 2010; PINO et al., 2007; PINO; FUENTES; BARRIOS, 2011).

3.4.1 Antocianinas

Antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração em flores, folhas e frutos em vegetais superiores. Nos últimos anos, os estudos com antocianinas aumentaram de forma substancial (DE PASCUAL-TERESA; MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2010; HIDALGO et al., 2012; HE; GIUSTI, 2010; KONCZAK; ZHANG, 2004), uma vez que a presença em frutas, legumes e vinhos está associada com a possível diminuição de doenças cardiovasculares, câncer e doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como por exemplo a doença de Alzheimer, entre outras (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

3.4.1.1 Aspectos químicos

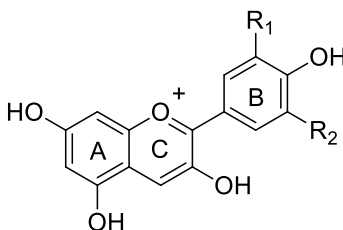
As antocianinas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, apresentando uma estrutura básica aglicona (C6-C3-C6), também denominada de antocianidina, além de grupos glicosídicos (açúcares), e também grupos acil. As antocianinas são derivados do núcleo 2-fenilbenzopirílio (cátion flavílio), o qual é formado por anel aromático (A) ligado a anel heterocíclico (C), e este último liga-se a um outro anel aromático (B) (Figura 4). Além disso, o cátion flavílio possui a característica de formar estruturas secundárias devido à solubilidade em água, pH favorável, e reações tautoméricas (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Outra importante característica das antocianinas é a presença de ligações duplas conjugadas, o que leva o aparecimento de coloração em

pH ácido. Tal fato se torna importante, uma vez que o máximo de absorção ocorre na faixa de 440 a 550 nm (FOSSSEN; ANDERSEN, 2006; GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Ademais, nos vegetais, a substituição por grupos hidroxilas e metoxila na molécula, também influenciam na coloração das antocianinas (DELGADO-VARGAS et al., 2000).

Embora existam cerca de 31 antocianidinas monoméricas identificadas, sabe-se que 90% de todas antocianinas descritas apresentam apenas seis antocianidinas em sua composição, destacando-se: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina (Figura 4). Além disso, existem mais de 630 antocianinas identificadas, e destas, 97% apresentam glicosídeos ligados ao núcleo fundamental. (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006; HE; GIUSTI, 2010)

Figura 4 - Estrutura química da antocianidina e seus substituintes.



Substituintes

R₁	R₂	Antocianina
OH	H	Cianidina
H	H	Pelargonidina
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina
OCH ₃	OH	Petunidina
OCH ₃	H	Peonidina
OH	OH	Delfinidina

Fonte: Adaptado de Andersen e Jordheim (2006)

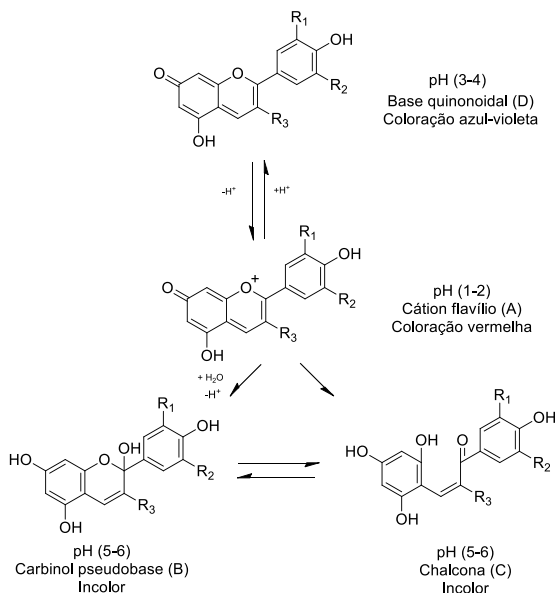
Segundo a literatura, a maioria das antocianinas apresenta de uma a três unidades de açúcares ligados ao núcleo básico (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Os principais açúcares encontrados em antocianinas são os monossacarídeos glicose, galactose, raminose, arabinose, xilose e ácido glicurônico. Além destes, os dissacarídeos também podem se ligar ao núcleo principal como, a sofrorose, rutinose,

sambubiose, gentiosbiose, entre outras (ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, 2006). Vale destacar também que a ligação entre a aglicona e as *oses*, em sua maioria, é do tipo *O-glicosídica*. Contudo, já foi descrito na literatura ligações tipo *C-glicosídica* (SAITO et al., 2003).

No que concerne à ligação de grupos acil em antocianinas, sabe-se que mais de 65% destes compostos apresentam-se acilados. Juntamente com as *oses*, os grupos acil ligados à molécula de antocianina favorecem a estabilidade quando comparado aos análogos não acilados (SAITO et., 1994; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006; HE; GIUSTI, 2010).

As antocianinas apresentam uma característica peculiar, pois são os únicos compostos presentes no grupo dos flavonoides capazes de se alterarem estruturalmente, em decorrência de variações do pH (DELGADO-VARGAS et al., 2000; HE; GIUSTI, 2010). Existem sete formas estruturais de equilíbrio nas antocianinas: cátion flavílio, base quinoidal, carbinol, pseudobase, chalcona na configuração E ou Z, e as formas ionizadas (ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, 2006; HE; GIUSTI, 2010). Em pH ácido (1-2), as antocianinas encontram-se predominantemente na forma de cátion flavílio, sendo esta a forma estrutural mais estável, apresentando cor vermelha em solução (Figura 5A). Em meio hidratado (pH 5-6), o cátion flavílio possui duas formas estruturais: carbinol pseudo base e chalcona (Figura 5BC), o que favorece a perda de coloração (HE; GIUSTI, 2010). Quando a solução apresenta pH entre 3 e 4, a estrutura base quinonoidal (Figura 5D) é a principal forma, levando o aparecimento de coloração azul-violeta (BROUILLARD; DUBOIS, 1977; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Quando o pH encontra-se acima de 7, as antocianinas são degradadas, ocorrendo a formação de diversos compostos dependendo do tipo de estrutura antociânica. É importante salientar que as antocianinas podem coexistir em quatro formas estruturais, quando o pH da solução estiver entre 4 e 6: cátion flavílio, base quinoidal anidra, carbinol e chalcona (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Figura 5 - Esquema estrutural de interconversão das formas de antocianinas pH dependentes



Fonte: Adaptado de Houbiers et al., (1998)

Em relação à estabilidade de antocianinas, as mesmas são instáveis ou susceptíveis a degradação devido a fatores como: pH, temperatura, estrutura química, proteínas, íons metálicos (GIUSTI; WROLSTAD, 2003; REIN, 2005) e concentrações de oxigênio (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As antocianinas apresentam maior estabilidade sob condições ácidas, contudo, ainda pode ocorrer degradação por alguns mecanismos, levando à perda de coloração (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Além disso, o aumento de grupamentos hidroxila promove a estabilização das antocianidinas (DAO et al., 1998), embora alguns autores relatem que o aumento de grupamentos metoxila pode diminuir a estabilidade de antocianinas, quando as mesmas encontram-se em pH neutro (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; FLESCHHUT et al., 2006; MAZZA; BROUILLARD, 1987).

Como dito anteriormente, a estabilidade de antocianinas também está relacionada à presença de açúcares ligados ao núcleo aglicona. Os açúcares diglicosídeos conferem uma maior estabilidade do

que açúcares monoglicosídeos. (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Segundo Wrolstad et al (1990), a sacarose é capaz de proteger as antocianinas de degradações em frutos congelados, inibindo reações enzimáticas ou reações de condensação. Tal proteção impede a formação de pigmentos poliméricos e diminuição de cor.

3.4.1.2 Métodos de extração

As técnicas mais usualmente utilizadas para a extração de compostos em frutos incluem principalmente a imersão direta dos frutos frescos no solvente extrator (MERKEN; BEECHER, 2000). Métodos convencionais acordo com solubilidade, temperatura, entre outras características. Nesse contexto, o método refluxo, o qual se emprega calor, é uma técnica de extração convencional, comumente utilizada na extração de compostos bioativos como o soxhlet, maceração, turbólise e refluxo são empregados de, como ácidos fenólicos e flavonoides e capsaicinoides (HIJAZI et al., 2013 KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Os métodos que utilizam altas temperaturas podem ser prejudiciais à extração de antocianinas, uma vez que os compostos são degradados em altas temperaturas e luminosidade (DYRBY; WESTERGAARD; STAPELFELDT, 2001). Dessa forma, o emprego de ondas de ultrassom tem sido descrito para a extração dos compostos em questão, já que não necessita o emprego de calor (CORRALES et al., 2008; ZOU et al., 2012). Outro fato a ser destacado é que o emprego de ultrassom permite aumento do rendimento da extração em antocianinas (DEMIRDOVEN; OZDOGAN TOKATLI, 2015). Outra técnica que vem sendo empregada é a extração supercrítica de produtos naturais (GAMARRA et al., 2009). O amplo emprego desta técnica ocorre devido a fatores tais como não toxicidade em pequenas quantidades, não inflamabilidade e principalmente devido aos valores brandos de sua temperatura (31,0° C) e pressão crítica (73,8 bar) (REVERCHON; ÓSSEO, 1994).

Os solventes comumente utilizados para a extração de compostos antociânicos em materiais vegetais são de natureza polar. Entre eles estão o metanol, etanol, acetona, e misturas aquosas destes solventes (KAHKONEN; HOPIA; HEINONEN, 2001). O fato de se utilizar solventes com maior grau de polaridade é devido às características estruturais, como por exemplo, a presença de *oses* que se ligam ao núcleo aglicona (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; KONG et al., 2003).

Outro importante fator na extração de antocianinas é o emprego de ácidos em baixas concentrações, pois o emprego de ácidos em

soluções extrativas favorece a estabilização estrutural das antocianinas (NACZK; SHAHIDI, 2004). Geralmente, os ácidos mais utilizados são o ácido clorídrico e fórmico (KONG et al., 2003).

Entretanto, deve-se salientar que o emprego de ácidos em altas concentrações pode levar à hidrólise total ou parcial de antocianinas aciladas (KONG et al., 2003; REVILLA; RYAN; MARTÍN-ORTEGA, 1998). De acordo com Moore et al., (1982), os ácidos podem favorecer a mudança da conformação das antocianinas, quebrando-as em artefatos, o que leva à formação de complexos com metais e copigmentos. Ademais, o processo de evaporação de solventes acidificados também pode levar à degradação das antocianinas, devido ao aumento da concentração dos ácidos empregados (KONG et al., 2003).

3.4.1.3 Métodos de caracterização de antocianinas

A identificação de antocianinas é uma importante ferramenta, no que diz respeito à avaliação da qualidade de produtos *in natura* ou processados, os quais contêm os referidos compostos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Dessa forma, as técnicas espectroscópicas e cromatográficas são as mais comumente empregadas para a caracterização e identificação de compostos antociânicos.

3.4.1.3.1 Espectrometria UV/Vis

O método do pH diferencial, é uma importante técnica que foi desenvolvida, com o intuito de quantificar antocianinas monoméricas totais (AMT) com a utilização de variações de valores de pH associada a espectrofotometria na região do visível (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; LEE; DURST; WROLSTAD, 2005). A quantificação é possível, uma vez que a propriedade de alternância estrutural das antocianinas, favorece a mudança de cor em diferentes faixas de pH. O cátion flavílio é a estrutura presente quando o valor de pH encontra-se próximo a 1,0. Por outro lado, o pH em 4,5 favorece o aparecimento da forma hemiacetal, a qual é incolor. Dessa forma, a diferença de absorbância será proporcional à concentração de coloração. (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; LEE; DURST; WROLSTAD, 2005; WROLSTAD; DURST; LEE, 2005). A técnica descrita apresenta como vantagem a rapidez e economia, quando comparada às técnicas mais sofisticada como a espectrometria de massas.

3.4.1.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é outra importante técnica empregada na identificação e quantificação de compostos antociânicos, oferecendo uma boa sensibilidade e rapidez (BUENO et al., 2012). A maioria dos métodos empregados para a identificação e quantificação de antocianinas ou antocianidinas consiste na utilização de colunas de fase reversa (BUENO et al., 2012), e os detectores mais comumente empregados são UV-Vis e arranjo de diodos (DAD) (MISSANG et al., 2003; BUENO et al., 2012).

Mesmo a técnica de CLAE/DAD ser a mais utilizada, a mesma, pode não apresentar especificidade para a identificação de todas as antocianinas. Tal fato se deve a compostos que possuem isômeros, o que torna a técnica muitas vezes inadequada. Assim, a utilização da espectrometria de massas (CL/EM), torna-se mais apropriada, pois na maioria dos casos, não necessita do processo de separação cromatográfica. Tal fato permite uma maior rapidez e seletividade (DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000).

3.4.1.3.3 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

Dentre as principais técnicas utilizadas para a caracterização e identificação das antocianinas, destaca-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL/EM) com ionização por *electrospray* (ESI-MS) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; WROLSTAD; DURST; LEE, 2005). Tais técnicas permitem a identificação das unidades de massas e seus respectivos fragmentos iônicos, com grande rapidez e reprodutibilidade (GIUSTI et al., 1999; WANG; KALT; SPORNS, 2000). Além da utilização da técnica espectroscópica para a elucidação estrutural de antocianinas, outros estudos indicam, que a espectrometria de massas pode ser utilizada na avaliação da estabilidade de antocianinas (BALDI et al., 1995; WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003) e na avaliação da polimerização com outros compostos (REMY-TANNEAU et al., 2003).

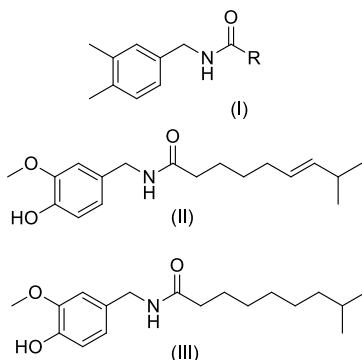
3.4.2 Capsaicinoides

Os capsaicinoides correspondem a um grupo de moléculas da classe dos alcaloides exclusivamente presentes em frutos do gênero *Capsicum* (WALSH; HOOT, 2001). Por outro lado, alguns pesquisadores classificam os capsaicinoides como compostos fenólicos (CHEN; KANG, 2013). Independente de sua classificação, os capsaicinoides são considerados os compostos responsáveis pela

característica de pungência dos frutos do gênero além de possuir importantes propriedades farmacológicas (THIELE; MUELLER-SEITZ; PETZ, 2008). Dois compostos presentes nesse grupo, denominados capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonamida) e a dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanililnonamida), se destacam uma vez que o teor estimado de sua composição nos frutos de pimentas do gênero *Capsicum* equivale a uma faixa que varia entre 77-98% (GOVINDARAJAN; RAJALAKSHMI; CHAND, 1987). Além desses dois compostos majoritários, o grupo dos capsaicinoides dispõe de outros constituintes que estão presentes em menor proporção nas pimentas, como a nordihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina, entre outros (CONSTANT; CORDELL; WEST, 1996; GIUFFRIDA et al., 2013; HUANG et al., 2013).

A biossíntese dos capsaicinoides provém da rota da síntese dos aminoácidos fenilalanina e valina por meio da via dos fenilpropanoides com o auxílio de enzimas distintas. Dessa forma, a estrutura química básica da referida classe corresponde a uma amida presente na estrutura básica da vanililamina combinada com ácido graxo saturado ou insaturado (AZA-GONZALEZ; NUNES-PALENIUS; OCHOA-ALEJO, 2011) (Figura 6). Os diferentes capsaicinoides diferem entre si no comprimento da cadeia carbônica lateral alifática ligada à estrutura química principal, a presença ou ausência de uma ligação dupla, o ponto de ramificação da cadeia alifática e por fim a pungência relativa (DIAZL et al., 2004; OCHI et al., 2003).

Figura 6 - Estruturas químicas dos principais constituintes dos capsaicinoides. (I) Capsaicinoides (R= Cadeia carbônica alifática); (II) Capsaicina; (III) Dihidrocapsaicina.



Fonte: Adaptado de Tonon de Souza e Rossi (2014)

Os capsaicinoides são sintetizados e acumulados principalmente na placenta, estrutura essa presente nos frutos das pimentas (IWAI et al., 1979). Os pesquisadores verificaram que a radioatividade dos capsaicinoides na placenta era maior quando comparada a outras estruturas, como o pericarpo, em todas as fases de maturação do fruto. Em outros estudos do mesmo grupo de pesquisadores, foi constatado que as células da epiderme da placenta (Figura 7) correspondem ao local de maior acúmulo dos capsaicinoides nos frutos (FUJIWAKE; SUZUKI; IWAI, 1982). Entretanto, além da placenta, os capsaicinoides podem ser encontrados em menor quantidade no pericarpo (Figura 7) e até mesmo em outros órgãos vegetais da planta tais como caule e folhas (ESTRADA et al., 2002). Em pimentas do gênero *Capsicum* a pungência dos frutos atribuída aos capsaicinoides é considerada característica crucial dessa classe de compostos (KAALE et al., 2002).

Os capsaicinoides possuem diferentes propriedades biológicas descritas como antitumorais (MACHO et al., 2003), antioxidantes (ALVAREZ et al., 2011), antiinflamatórias (SPILLER et al., 2008) e antimicrobianas (CAREAGA et al., 2003) entre outras.

Figura 7 – Divisão das estruturas do fruto da variedade pimenta bode-roxo (*Capsicum chinense* Jacq.)



Fonte: Autor (2015)

3.4.2.1 Capsaicina

A capsaicina corresponde a aproximadamente 71% do total de capsaicinoides presentes nos frutos do gênero *Capsicum*, o que a torna um dos principais parâmetros para avaliar a qualidade comercial dos frutos (OTHMAN et al., 2011; ZHANG et al., 2007). A importância da capsaicina se deve principalmente ao fato de ser o principal componente responsável pelas propriedades organolépticas conferindo sensação de ardor às pimentas (NWOKEN et al., 2010).

3.4.2.1.1 Distribuição da capsaicina nos frutos

Estudos recentes indicam que o maior teor de capsaicina é encontrado em vesículas ou vacúolos de organelas subcelulares da epiderme da placenta, sendo essa a estrutura vegetal responsável pela sua produção (CHEEMA; PANT, 2011). Por outro lado, na maioria dos frutos as sementes possuem as menores concentrações do referido composto e não são consideradas fontes de pungência (SUPALKOVA et al., 2007). As referidas estruturas absorvem pouca quantidade de capsaicina, uma vez que estão localizadas próximas a placenta. De maneira geral, o teor de capsaicina presente nas sementes e pericarpo varia entre uma faixa correspondente a 5-6%, enquanto que na placenta esse número pode chegar a 98% (GOVINDARAJAN; RAJALAKSHMI; CHAND, 1987)

É importante ressaltar que o teor de capsaicina presente nas pimentas pode variar entre diferentes variedades da mesma espécie. Já a intensidade da pungência é influenciada por condições climáticas, como elevada temperatura, e estágio de maturação do fruto (ARORA et al., 2011).

3.5 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO *CAPSICUM*

De acordo com a literatura pimentas do gênero *Capsicum* possuem atividades farmacológicas, dentre elas ressaltam-se as atividades: antioxidantes (MATERSKA; PERUCKA, 2005; MARTESKA et al. 2015) e antimicrobiana (DORANTES et al., 2000; KAPPEL et al., 2007).

Considerando os objetivos do presente trabalho, o foco da presente revisão será nas atividades antioxidante e antimicrobiana.

3.5.1 Atividade antioxidante

3.5.1.1 Radicais livres

Os radicais livres podem ser definidos como átomo ou molécula de existência independente e que possuem na sua estrutura um ou mais elétrons na forma desemparelhada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LOBO et al., 2010). De maneira simplificada, o termo radical livre se refere a qualquer átomo altamente reativo, que contém um número ímpar de elétrons em sua camada eletrônica (HALLIWELL, 1999).

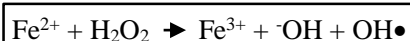
Os radicais livres podem ser gerados em uma variedade de processos químicos incluindo processos biológicos do corpo humano. Nesse caso, os níveis de radicais livres são controlados por um mecanismo complexo envolvendo defesas antioxidantes que minimizam

o dano oxidativo de biomoléculas. Com isso, o possível desequilíbrio entre o aumento da geração de radicais livres e a eficiência dos mecanismos antioxidantes no organismo favorecem o aparecimento de doenças caracterizadas por intensa lesão tecidual (HALLIWELL, 2001).

As espécies reativas de oxigênio provêm de um termo coletivo que inclui não só os radicais livres centrados no oxigênio tais como o radical superóxido, hidroperóxil e hidroxil ($O_2\bullet$, $HO_2\bullet$ e $OH\bullet$, respectivamente), mas também outros derivados do metabolismo do oxigênio que não são considerados radicais livres uma vez que não possuem elétrons desemparelhados na última camada, como, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o oxigênio singleto (1O_2) (HALLIWELL, 2005). Estes são caracterizadas por grande instabilidade e por isso elevada reatividade, e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (agentes oxidantes) ou como doadores (agentes redutores) de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas constantemente no citoplasma, mitocôndria e membrana celular. Alguns mecanismos de formação desses radicais incluem "acidentes químicos", como por exemplo, a geração de fluxo constante de radical superóxido da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Outros mecanismos envolvem a quebra da ligação entre os átomos de hidrogênio e oxigênio em meio aquoso, quando células são expostas a frequentes ionizações. A principal consequência da quebra das ligações entre esses dois compostos consiste na geração de radicais hidroxil e posterior danos oxidativos a proteínas, lipídios e moléculas de DNA (HALLIWELL, 2005). É importante ressaltar também que muitos metais pesados estão envolvidos na formação das EROs. Um dos processos oxidativos envolvendo a interação *in vitro* entre metais pesados e EROs consiste na reação de Fenton (Figura 8). Essa por sua vez é caracterizada pela reação entre Fe^{2+} e H_2O_2 desencadeando a geração de radicais hidroxil que podem atuar como um eletrófilo ou como um nucleófilo, atacando moléculas orgânicas (AGUIAR et al., 2007).

Figura 8 - Reação de Fenton.



Fonte: Adaptado de Aguiar et al., (2007)

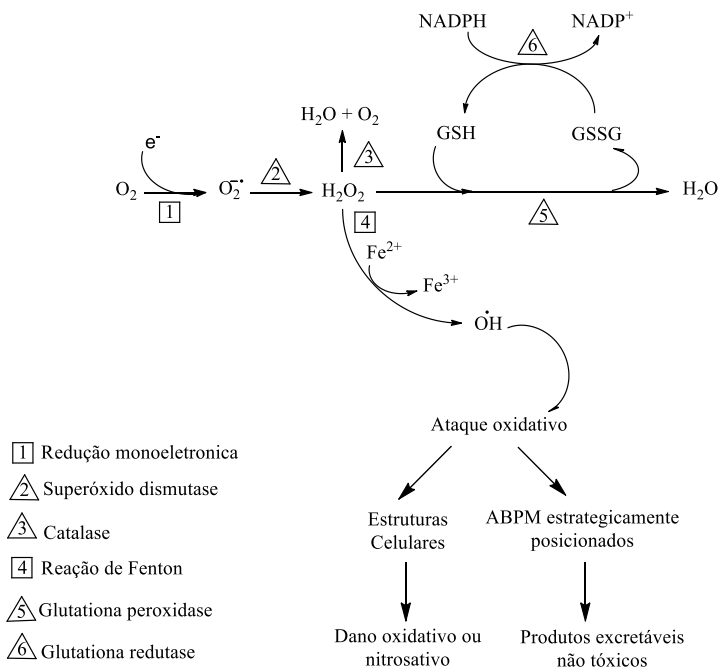
3.5.1.2 Antioxidantes e Estresse Oxidativo

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis. Nesse sentido, um determinado composto com atividade antioxidante possui a capacidade de liberação do hidrogênio, o qual reage e elimina a ação negativa de diversos radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O consumo de antioxidantes naturais tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas à formação exacerbada de radicais livres com conseqüente dano celular (DROGE, 2002).

O grupo dos antioxidantes enzimáticos incluem enzimas endógenas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSHPx). A SOD possui papel fundamental na remoção do ânion superóxido convertendo o mesmo em peróxido de hidrogênio. As células do organismo humano também dispõem de enzimas SODs contendo manganês (MnSOD), cobre e zinco (CuZnSOD) em determinados sítios de ligação da estrutura fundamental da SOD. A enzima catalase converte H_2O_2 em água e O_2 . Entretanto, a GSHPx é considerada a principal enzima endógena do corpo humano com papel essencial no controle dos níveis de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos. A GSHPx possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Devido a essa característica peculiar, é considerada uma das únicas classes de enzimas humanas que requerem selênio para exercer sua função. A ação da glutathione peroxidase baseia-se essencialmente na oxidação da glutathione reduzida. Essa reação ocorre concomitantemente à reação de redução de H_2O_2 a H_2O . Dessa forma, a enzima glutathione peroxidase promove a remoção do peróxido de hidrogênio. Outra enzima que age conjuntamente a GSHPx é denominada glutathione redutase. Essa enzima, por sua vez, não age diretamente na remoção de radicais livres, mas é responsável pela regeneração da glutathione na forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Assim, a glutathione redutase tem por objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (HALLIWELL, 2005; ROVER JUNIOR et al., 2001).

No corpo humano saudável, coexiste um balanço entre a produção de radicais livres e agentes antioxidantes (HALLIWELL, 2005). A Figura 9 demonstra, de forma resumida, os vários mecanismos de produção de EROs e dos mecanismos de defesa antioxidante.

Figura 9 - Mecanismos de formação de espécies reativas de oxigênio a partir da redução mono eletrônica de O_2 e os diversificados mecanismos de defesa antioxidante.



Fonte: Adaptado de Gandra et al., (2004)

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, possui como consequência a diminuição dos antioxidantes endógenos e ou o aumento da geração de espécies oxidantes, gerando um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo desencadear morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Esse tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (SIES, 1991).

3.5.1.3 Estresse oxidativo em lipídios

As EROs comumente promovem a peroxidação de lipídios, em membranas de organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos, uma vez que as mesmas possuem em sua estrutura ácidos

graxos polinsaturados. (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999). Nesse contexto, a peroxidação lipídica ocorre principalmente pelo ataque dos radicais hidroxil, alcoxil e peroxil (DI MEO et al., 2013). Além disso, algumas lipoproteínas envolvidas na absorção de lipídios por meio da dieta podem sofrer dano oxidativo. Por exemplo, as lipoproteínas de baixa densidade sofrem peroxidação, o que pode contribuir para a aterosclerose (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2015).

3.5.1.4 Atividade antioxidante em pimentas do Gênero *Capsicum*

Estudos epidemiológicos apontam uma associação entre o consumo diário de compostos fenólicos com a diminuição da propensão do desenvolvimento de doenças cardíacas e câncer (HERTOG et al., 1997; MARIN et al., 2004). As propriedades antioxidantes desses compostos estão relacionadas principalmente com a atividade redox dos grupamentos hidroxilas bem como com as relações estruturais entre diferentes grupamentos da estrutura química principal (MARTESKA; PERUCKA, 2005). Além da relação da composição química dos compostos fenólicos com as propriedades antioxidantes, outros estudos abordam que esses metabólitos interagem com proteínas específicas da cascata de sinalização intracelular potencializando os mecanismos antioxidantes (SCHROETER et al., 2002; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

Marteska e Perucka (2005) avaliaram a atividade antioxidante dos capsaicinoides em frutos verdes e vermelhos de diferentes cultivares do gênero *Capsicum*. Os resultados encontrados demonstraram um elevado potencial antioxidante para as pimentas, sendo que para todos os cultivares, o potencial antioxidante dos frutos maduros foram superiores quando comparado aos frutos imaturos. Existem ainda poucos estudos que correlacionam a atividade antioxidante dos capsaicinoides, em especial a capsaicina e a dihidrocapsaicina, com sua estrutura química. Entretanto, sabe-se o potencial antioxidante dos capsaicinoides se deve a porção fenólica de sua estrutura química geral, e não ao grupamento amida (HENDERSON; SLICKMAN; HENDERSON, 1999). Somado a isso, já foi relatado na literatura que a referida atividade farmacológica da capsaicina é superior a dihidrocapsaicina. Assim a presença de uma dupla ligação na porção lipídica da estrutura dos capsaicinoides também parece relacionada com o aumento da função antioxidante dessa classe de compostos (MARTESKA; PERUCKA, 2005).

As antocianinas responsáveis pelo pigmento de frutos também apresentam estas mesmas propriedades. Kuskoski e colaboradores (2006) avaliaram o potencial antioxidante de diferentes polpas de frutos vermelhos. Segundo os pesquisadores, frutos sem pigmentos antocianínicos apresentaram atividade antioxidante inferior. O potencial antioxidante das antocianinas também está relacionado com a capacidade de remoção dos radicais livres com auxílio da porção fenólica da estrutura química. No entanto, além da importância dos grupamentos fenólicos, a função antioxidante das antocianinas é influenciada pela conjugação e o ângulo diedro formado entre os anéis A, B e C que formam o núcleo aglicona, bem como o número de substituintes nas posições dos anéis (CANUTO et al., 2016).

Os compostos fenólicos não podem ser sintetizados naturalmente pelo corpo humano e dessa forma, devem ser ingeridos por meio da dieta. Assim, o conhecimento a respeito do papel nutricional e terapêutico dos antioxidantes fenólicos presentes em espécies vegetais é fundamental para o desenvolvimento de alimentos funcionais e de uma dieta que traga benefícios para a saúde humana (FERRARI; TORRES, 2003).

3.5.2 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas, em especial as causadas por bactérias, representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre a população, principalmente nos países subdesenvolvidos (NASCIMENTO et al., 2000). Nesse contexto, nos últimos anos um número elevado de microorganismos desenvolveu resistência aos antimicrobianos convencionais, principalmente pelo uso indiscriminado desses fármacos no tratamento de doenças. Geralmente, quando a bactéria desenvolve um mecanismo de resistência a um determinado antibiótico, essa característica é transmitida geneticamente durante o processo de replicação (NASCIMENTO et al., 2000; PITTET, 2005).

Nos últimos anos, vários estudos trazem evidências científicas da eficiência de compostos naturais no combate a infecções. Dentre esses compostos destacam-se os compostos fenólicos simples (ADWAN; ABU-SHANAB; ADWAN, 2009; BETONI et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2000), cujos mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana estão relacionados com o número de grupamentos hidroxilas na estrutura química principal. Assim os compostos oxidados são responsáveis pela inibição da ação de enzimas bacterianas bem como interação com proteínas de seu metabolismo (COWAN, 1999).

Outros metabólitos específicos investigados devido as suas propriedades antimicrobianas incluem os flavonoides. Esses por sua vez são efetivos devido a sua capacidade de se complexar com proteínas bacterianas extracelulares bem como com a parede celular das bactérias (COWAN, 1999). Além dos flavonoides, os capsaicinoides também são reconhecidos por sua ação antimicrobiana. Nesse sentido, estudos que verificam a eficiência de extratos de pimentas do gênero *Capsicum* frente a ação de bactérias vem ganhando destaque (CARVALHO; WIEST; CRUZ, 2010, KAPPEL, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas, flores e frutos de *Capsicum chinense* Jacq. (pimenta bode) foram adquiridos comercialmente, no município de Palhoça no estado de Santa Catarina (27°48'12.6" S; 48°37'51.4" W) sendo cultivados por produtor local. Os frutos foram separados em três partes distintas: pericarpo, semente e pedúnculo, os quais foram posteriormente congelados e armazenados a -20° C até posterior utilização. O material vegetal foi identificado pelo pesquisador Luciano de Bem Bianchetti da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e material testemunho foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 53452).

4.2 PROCESSO EXTRATIVO

Dez gramas das partes descongeladas dos frutos (pericarpo, semente e pedúnculo) foram submetidas à extração com 250 mL de metanol 70% por 20 minutos sob refluxo (70°C) ou ultrassom. Após a realização do primeiro ciclo de extração, os extratos foram filtrados e o material novamente submetido a extração nas mesmas condições de volume, tempo e líquido extrator. Os extratos obtidos foram combinados, o líquido extrator eliminado sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotatório, liofilizados e armazenados a -20 °C para posterior utilização. Todos os procedimentos descritos foram realizados em duplicata e com auxílio de vidraria âmbar e ao abrigo da luz.

4.3 ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

A determinação do teor de fenólicos totais (TFT) foi realizada de acordo com duas metodologias espectrofotométricas: Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e Fast Blue BB (MEDINA, 2011a,b).

4.3.1 Folin Ciocalteu

A quantificação do TFT nos extratos foi realizada com utilização do reagente Folin-Ciocalteu, o qual reage com compostos fenólicos em condições alcalinas. Uma curva analítica foi preparada utilizando cinco soluções aquosas de ácido gálico na faixa de 100-400 µg.mL⁻¹. Foram adicionados 0,5 mL de água ultra pura, 0,125 mL de cada solução aquosa de ácido gálico e 0,125 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após seis minutos, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃ 7%) e 3 mL de água ultra pura em balão volumétrico.

A reação permaneceu à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 90 minutos e as absorbâncias foram mensuradas a 760 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito foi empregado para a obtenção do TFT dos extratos metanólicos (5 mg.mL⁻¹) de *C. chinense* Jacq. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG.g⁻¹ES).

4.3.2 Fast Blue BB

O TFT foi avaliado pela utilização do sal de diazônio Fast Blue BB, o qual interage diretamente com compostos polifenólicos. Dessa forma, foram adicionados 1,0 mL de solução do extrato metanólico de *C. chinense* Jacq. (5 mg.mL⁻¹) em balão volumétrico, e posteriormente adicionado 0,10 mL do reagente Fast Blue BB a 0,1%. A solução de reação foi homogeneizada por 1,0 minuto e alíquotas de 0,10 mL de NaOH 5% foram adicionadas. A reação permaneceu à temperatura ambiente por 90 minutos ao abrigo da luz, e as absorbâncias foram mensuradas a 420 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento foi empregado para elaborar a curva analítica, a partir de soluções metanólicas de ácido gálico na faixa de 5-125 µg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG.g⁻¹ES). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.4 ANÁLISE DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS (FT)

A determinação do teor de flavonoides totais (FT) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miliuauskas et al (2004), com adaptações. A técnica consiste no complexo formado entre flavonoides e o AlCl₃ 10%. Para a construção da curva analítica foram preparadas cinco soluções aquosas de rutina na faixa de 1-150 µg.mL⁻¹. Assim, 0,20 mL dessas soluções foram transferidas para balão volumétrico de 5,0 mL contendo 0,20 mL de solução de AlCl₃ 10% e o volume final foi ajustado com água obtida por osmose reversa. Após 40 minutos de reação ao abrigo da luz, a mensuração das absorbâncias foram efetuadas a 415 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de rutina por grama de extrato seco (mg ER.g⁻¹ES).

4.5 ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS

Para a análise dos teores de antocianinas monoméricas totais (AMT), foi empregado o método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

4.5.1 Método pH diferencial

O método avalia as transformações estruturais reversíveis de antocianinas, a partir de duas soluções tampão: solução cloreto de potássio (0,025 M) em pH 1, e solução de acetato de sódio (0,4 M) com pH 4,5. A seguir, 5,0 mL de cada solução tampão foram adicionados a 0,5 mL das diferentes amostras. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias foram mensuradas em dois comprimentos de onda (520 e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de AMT por grama de extrato seco, baseado nas equações 1 e 2 descritas por Giusti e Wrolstad (2001) e demonstradas abaixo:

$$A = [(A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}]$$

Equação 1

$$\text{AMT (mg ED.g ES}^{-1}\text{)} = A \times MM \times FD \times 100 \div \varepsilon \times L$$

Equação 2

Em relação às equações descritas, MM é a massa molecular do padrão utilizado para expressar os resultados; FD é o fator de diluição envolvido na análise; ε é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$); L trata-se do caminho óptico (cm); ED significa equivalentes de delfinidina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo, e ES corresponde ao extrato seco.

O peso molecular utilizado para o cálculo dos teores de AMT foi 773,4 unidades de massa atômica, referente à delfinidina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo, antocianina descrita em espécies de pimentas.

4.6 ANÁLISE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) (Q-TOF)

A identificação de antocianinas majoritárias nos extratos metanólicos de *C. chinense* Jacq. foi realizada apenas nos extratos preparados a partir do pericarpo.

Esta análise foi efetuada por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Waters Acquity UPLC - Xevo® G2-S QTOF, MA, USA), associado a um detector equipado com interface de ionização por

electrospray (ESI-MS – *electrospray* ionization mass spectrometry), híbrido composto por dois analisadores de massas em série: quadrupolo (Q) e tempo de voo (ToF). Os dados foram adquiridos por meio do Software MassLynx v.4. e a tensão do spray no sistema foi obtida em modo positivo. O espectro de massas foi adquirido na faixa de m/z 100-1000, apresentando voltagens de 1000 V e 50 V, no capilar e no cone, respectivamente. O gás utilizado para nebulização foi o nitrogênio, e o mesmo possuía fluxo de gás no cone de 10 L/h. O fluxo de desolvatação foi de 300 L/h, a temperatura de desolvatação - 300°C e temperatura da fonte - 120°C.

As amostras foram filtradas com membrana 0.22 μm , analisadas na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e mantidas em temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). A identificação foi desenvolvida em Coluna C18 - Kinetex[®] (100 mm x 2,1 mm - 1,7 μm), com temperatura de forno de 40°C. Os solventes utilizados na separação foram acetonitrila (A) e solução aquosa acidificada com ácido fórmico 0,1% (B). O gradiente de eluição se iniciou com 5% do solvente A, até 58% do mesmo em um tempo de análise de 8 minutos. O volume de injeção utilizado foi 5 μL e o fluxo da análise foi de 0,5 mL/min.

4.7 ANÁLISE DOS TEORES DE CAPSAICINA E DIHIDROCAPSAICINA

Os teores de capsaicina e dihidrocapsaicina foram determinados utilizando-se CLAE PerkinElmer[®] Série 200, bomba binária, desgaseificador on-line, e amostrador automático. A separação ocorreu em temperatura de 40 °C, utilizando-se coluna Brownlee[®] Choice C-18 (150 × 4,6 mm; 5 μm) como fase estacionária. O gradiente de eluição iniciou-se com fase móvel composta de acetonitrila (A) e água acidificada com ácido acético 1% (B). As condições iniciais foram: 0-13 minutos isocrático (A:B) (45:55, v/v); 13-16 minutos gradiente linear partindo de A-B (45:55, v/v) até A-B (60:40, v/v) e 16-22 minutos gradiente isocrático A-B (60:40 v/v). As análises foram realizadas sob fluxo de 1,0 mL/min. As amostras foram analisadas nas concentrações de 25 mg/mL, com volume de injeção de 20 μL . A detecção foi conduzida em comprimento de onda de 280 nm, e os dados foram processados utilizando o software TotalChrom[®] Workstation.

Os capsaicinoides foram identificados e quantificados por meio da comparação entre os tempos de retenção das amostras e as substâncias de referência empregadas (capsaicina e dihidrocapsaicina), por coinjeção entre amostra e substâncias de referência. As análises

foram realizadas apenas nos extratos do pericarpo e semente, em triplicata.

4.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

4.8.1 Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP)

A determinação do potencial antioxidante reativo total (TRAP) foi avaliada pela capacidade antioxidante não enzimática dos extratos *in vitro*. A técnica empregada consiste na quantificação da intensidade da quimiluminescência gerada pela reação entre o luminol e radicais peroxilas, os quais são provenientes da termólise do gerador de radical 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) diidrocloreto (AAPH) (LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992; WAYNER et al., 1985). Previamente, foi preparado um sistema gerador de radical constituído por AAPH (10 mM) e luminol (50 mM), dissolvidos em tampão glicina (0.1 M, pH 8.6). A estabilização desse sistema permaneceu em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, a reação iniciou adicionando-se 20 µL de amostras (100 µg.mL⁻¹) em placas com cavidades e, em seguida, 18 µL do sistema gerador. Como controle positivo foi utilizado Trolox. A emissão de quimiluminescência foi monitorada por 120 minutos após a adição do trolox (20 mM) em aparelho Micro Beta Luminescence Counter (PerkinElmer®, MA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram plotados em percentual de contagem por minuto (% quimiluminescência) *versus* tempo (minutos).

O índice de reatividade antioxidante total (TAR) foi avaliado, e consiste na análise do decréscimo inicial da luminescência emitida pelo sistema (AAPH-luminol), indicando a reatividade inicial das amostras quando comparado ao controle. O TAR foi calculado como a razão entre I_0/I , onde I_0 é valor inicial da emissão de quimiluminescência (antes da adição da amostra), e I é o valor da intensidade da luminescência instantânea após a adição da amostra ou controle.

4.8.2 Determinação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP)

A capacidade do poder antioxidante de redução do íon férrico foi avaliada de acordo com método descrito por Benzie e Strain (1996). O método se baseia na reação de transferência de elétron entre o complexo íon férrico -2,4,6-tripiridiltriazina [Fe⁺³(TPTZ)₂] e o agente antioxidante presente na amostra, levando à redução íon ferroso Fe⁺². Inicialmente, foi preparado o regente FRAP, contendo 2,5 mL de

solução de TPTZ (10 mM), 2.5 mL de solução de FeCl_3 (20 mM) e 25 mL de tampão acetato (0.3 M). Posteriormente, 5,8 μL das amostras (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram misturadas com 17,6 μL do reagente FRAP, e 17,6 μL de água (osmose reversa). Após 30 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi medida em comprimento de onda de 595 nm. Para a calibração, foi construída uma curva analítica de solução etanólica de sulfato ferroso (FeSO_4) na faixa de 500 – 2000 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram efetuadas em triplicata, e os valores de FRAP foram calculados com base na curva analítica. Os resultados foram expressos em equivalentes a 1000 μM de sulfato ferroso por miligrama de amostra. (Eq. 1000 μM SF. mg^{-1}).

4.8.3 Avaliação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) via redução do azul de Nitrotetrazólio (NBT)

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) via redução do NBT consiste na foto-oxidação da riboflavina, a qual produz radicais superóxido, reduzindo o NBT ao produto final formazan. O produto formado é avaliado por espectrofotometria no comprimento de onda de 560 nm. (BEYER; FRIDOVICH, 1987). A técnica iniciou com a preparação do sistema de reação, composto por tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7.8), azul de NBT (17 mM), metionina (20 mM) e Triton X-100 (0,025%). Esse sistema foi utilizado para o emprego na reação, juntamente com a riboflavina (16.2 mM) e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ das amostras. Tal mistura de reação foi exposta à luz fluorescente (60 W) em intervalos de 5 minutos até posterior estabilização da absorção de reação. Uma unidade de SOD foi definida como o valor necessário para promover a inibição de 50% do produto final da reação, NBT. Foi utilizado uma solução branco contendo riboflavina (16.2 mM), tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7.8) e, sistema de reação para posterior comparação frente aos resultados encontrados. Os resultados foram expressos como unidades de SOD.mg extrato seco (U SOD. mg^{-1}).

4.8.4 Avaliação da capacidade de captura do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

A determinação do efeito *in vitro* dos extratos metanólicos contra a produção do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) proveniente da degradação da 2-desoxirribose foi avaliada de acordo com Lopes et al., (1999). Resumidamente, foram adicionados ao sistema de reação: 100 μL de 2-desoxirribose, amostras (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sulfato ferroso (60 mM), e H_2O_2 (1 mM) nas mesmas proporções de volume, e em seguida, 700 μL de tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7.2). A reação foi incubada por 10

minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 500 μL de ácido fosfórico (4%), seguido da adição de 500 μL de ácido-2-tiobarbitúrico (TBA 1%) em solução hidróxido de sódio (50 mM). As soluções foram aquecidas em banho maria durante 15 minutos a 95 °C, depois resfriadas, e as leituras realizadas em comprimento de onda de 532 nm. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em percentual de degradação da 2-desoxirribose (% 2-DR) comparado ao trolox.

4.8.5 Avaliação da peroxidação lipídica pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada pela metodologia descrita por Hodges et al., (1999), e consiste na quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA), o qual é um produto final da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Primeiramente, gema de ovo foi homogeneizada e utilizada como substrato rico em lipídios. 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ das amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado com ácido tricloroacético (TCA) (20%) e centrifugado a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 100 μL foi adicionada a microplaca com o mesmo volume de ácido-2-tiobarbitúrico (TBA) (0,67%). Esta solução reacional foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 30 minutos, arrefecida e quantificada nos comprimentos de onda de 440, 532 e 600 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram calculados com a seguinte fórmula:

$$(1) [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})] = A \quad \text{Equação 1}$$

$$(2) (Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) \cdot 0,0571^* = B \quad \text{Equação 2}$$

$$(3) [(532 - 600) - (440 - 600)] = C \quad \text{Equação 3}$$

$$(4) C \times 100 / C_{\text{Sistema-indutor}} = \% \text{ de formação de MDA} \quad \text{Equação 4}$$

Em relação às equações descritas, a equação (1) é a diferença entre as leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda 532 nm, que representa a absorbância máxima do complexo TBA-MDA, e 600 nm o qual representa a correção para a turvação não específica; (2) corresponde às leituras referentes à diferença entre os interferentes no

comprimento de onda 440 nm, e 600 nm, e 0,0571 é o valor referente à absorvância molar (AM) da sacarose para as leituras nos comprimentos de onda em 532 e 440 nm; (3) corresponde à diferença entre os valores encontrados em (1) e (2); (4) é o valor final encontrado, proveniente da razão entre o valor obtido na equação (3) multiplicado por 100, pelo valor do sistema indutor na reação.

Os resultados finais foram expressos em percentual de formação do MDA (% MDA).

4.9 AVALIAÇÃO DA ANTIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS EXTRATOS OBTIDOS POR REFLUXO DAS DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE *C. chinense* Jacq.

A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica no extrato metanólico obtido por refluxo foi realizada por meio do método de difusão em disco conforme as normas preconizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2003a).

Inicialmente, foram preparadas suspensões por meio do método direto, inoculando-se colônias do micro-organismo a serem avaliados em solução fisiológica esterilizada até que fosse alcançada a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A respectiva suspensão foi mensurada em espectrofotômetro (PerkinElmer[®], Lambda 25 UV/Vis) no comprimento de onda de 625 nm, correspondendo a uma absorvância entre 0,08 a 0,10. Posteriormente, placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Muller-Hinton (HIMEDIA[®]) foram utilizadas para a inoculação da suspensão do micro-organismo com o auxílio de swab. Tal procedimento foi realizado por meio da técnica de três direções.

Discos de papel filtro com diâmetro de seis milímetros (mm) foram impregnados com 25 µL dos extratos (2 mg/disco), e posteriormente adicionas nas placas de Petry com meio de cultura previamente inoculado, os controles positivos e negativos.

Disco de papel filtro contendo 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth[®]), foram utilizados como controle negativo, não sendo observado inibição. Para o controle positivo, utilizaram-se discos de antibiótico de referência, os quais foram selecionados de acordo com a sensibilidade dos micro-organismos testados. As cepas e os antibióticos usados foram:

Clostridium sporogenes (ATCC 11437), imipenem; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), ampicilina; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), oxacilina ; *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), ceftadizina; *Streptococcus pneumoniae*(ATCC 49619), cloranfenicol; *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), levofloxacina; *Escherichia coli*

(ATCC 25922), ampicilina; *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), cloranfenicol; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), doxicilina; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), ceftadizina; *Salmonella typhimorium* (ATCC 14028) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022), doxicilina. Cepas de fungos e antibióticos testados: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803), fluconazol.

As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C (16-18h), e posteriormente foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicata.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Neste estudo os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Em relação à comparação das médias aritméticas, foi empregado o Teste T de Student, correlação de Pearson, adotando-se o nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram avaliados com a utilização do *software GraphPad Prism 5*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO

Diante dos métodos extrativos empregados, os rendimentos dos extratos obtidos por refluxo foram de 466,3, 435,75 e 285,66 mg.g de extrato seco para as estruturas pericarpo, semente e pedúnculo, respectivamente. Já para o processo extrativo por ultrassom, os rendimentos dos extratos obtidos foram de 450,93, 392,34 e 265,45 mg para as estruturas pericarpo, semente e pedúnculo, respectivamente. De acordo com os rendimentos encontrados, foi possível observar que o método extrativo por refluxo apresentou as maiores massas comparando-se com a técnica por ultrassom.

Diversos processos extrativos são utilizados na área de química de produtos naturais com o intuito de extrair compostos de interesse. No caso dos polifenóis, um dos principais métodos utilizados para a extração é o refluxo, o qual se destaca pela facilidade de operação (BAI et al., 2010; MASAWAKI; TAYA; TONE, 1996). O método de extração por refluxo utiliza calor, técnica esta que tem como principal vantagem ser eficiente no que diz respeito à reutilização do líquido extrator. No entanto, tal método extrativo influencia na degradação dos compostos de interesse (KRELL, 1982) e acarreta em um baixo rendimento de extração devido à degradação térmica ou oxidação dos compostos químicos (BAI et al., 2010). Nesse contexto, a temperatura deve ser controlada e monitorada.

Adicionalmente, nos últimos anos, a técnica de extração por meio de ultrassom tem se destacado por sua rapidez, redução no consumo de solvente, além de evitar degradações dos compostos, uma vez que não há emprego de calor (BAI et al., 2010). Tal processo consiste em correntes de alta frequência, as quais levam a fragmentação das estruturas e membranas das células vegetais favorecendo a liberação dos compostos químicos. A referida técnica vem sendo regularmente empregada na extração de antocianinas (HOUGHTON; RAMAN, 1998).

5.2 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NAS DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE *C. chinense* Jacq.

A determinação do teor de fenólicos totais (TFT) nas três partes do fruto de *C. chinense* Jacq. foi realizada por meio do método descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) com adaptações e

pelo método do sal de diazônio Fast Blue BB, desenvolvido por Medina (2011a,b).

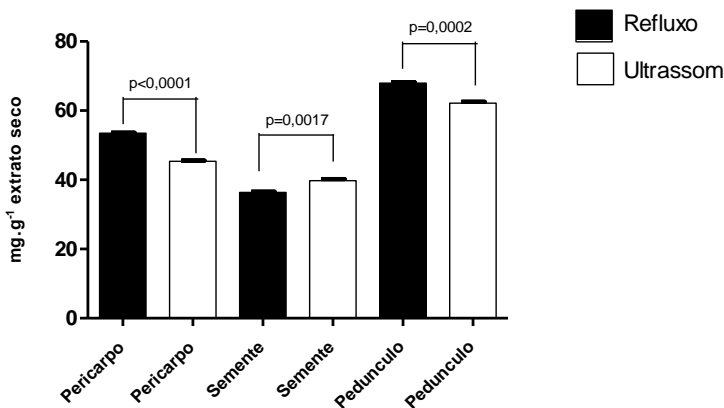
De acordo com os resultados adquiridos, foi possível comparar ambas as metodologias empregadas, uma vez que a técnica de Folin-Ciocalteu pode apresentar interferentes, os quais podem superestimar os resultados.

5.2.1 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu consiste na quantificação indireta de compostos fenólicos totais, por meio da transferência de elétrons para o complexo azul cromóforo formado por fosfotungstato-molibdato, os quais estão presentes no reagente de Folin Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCHOFIELD; MBUGUA, 2001). O método empregado é amplamente descrito na literatura, uma vez que possui boa reprodutibilidade e é considerado de fácil aplicação (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). No entanto, vale ressaltar que o método não é específico, pois os reagentes utilizados podem complexar com outros componentes dos extratos, como proteínas, açúcares e outros compostos redutores como, por exemplo, o ácido ascórbico (NACZK; SHAHIDIB, 2004).

Os resultados encontrados demonstram existir diferença significativa entre os dois processos extrativos para as mesmas partes do fruto (Figura 10). O método extrativo por refluxo apresentou os teores mais elevados de compostos fenólicos para o pericarpo e pedúnculo quando comparado ao processo por ultrassom. No entanto, o método extrativo por ultrassom foi capaz de extrair maior teor de fenólicos a partir das sementes quando comparado ao método por refluxo. Além disso, a parte do fruto que obteve o maior teor de fenólicos totais pela técnica realizada foi o pedúnculo (67,98 mg de EAG. g⁻¹ extrato seco).

Figura 10 – TFT pela técnica de Folin-Ciocalteu. Valores de p entre as estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos. (Teste T não pareado).



Esses resultados são discordantes de outros estudos previamente descritos para outras variedades do gênero *Capsicum*, pois em trabalhos anteriores os maiores teores de compostos fenólicos foram detectados nas sementes (CONFORTI; STATTI; MENICHINI, 2007; DEEPA et al., 2007; KAPPEL et al., 2007).

Além disso, sabe-se que os teores de compostos fenólicos são influenciados pelo estágio maturativo. Nesse contexto pode-se destacar o trabalho de Kappel et al., (2007) onde os autores avaliaram o teor de compostos fenólicos em frutos maduros (vermelhos) e imaturo (verdes) de *C. baccatum* var. *pendulum*. Os teores encontrados expressos em equivalentes de ácido clorogênico (EAC) foram de 58,47 mg de EAC.g⁻¹ extrato seco para a parte semente, e 15,24 mg de EAC.g⁻¹ extrato seco para o pericarpo maduro.

Melo et al., (2011) analisaram o TFT no pericarpo da espécie *C. chinense* (bode). O trabalho evidenciou que a variedade estudada apresentou um teor de fenólicos totais de 2,94 mg.g⁻¹ de fruto seco. Ressalta-se que no estudo abordado não está descrita a coloração do fruto utilizado. Outro estudo realizado por Moresco (2013) avaliou o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos do pericarpo na espécie *C. chinense*, variedade pimenta de cheiro. O resultado obtido foi de 0,934 mg de EAG.g⁻¹ extrato seco.

O presente estudo demonstrou que a variedade bode-roxo apresentou um teor superior de fenólicos totais no pericarpo quando comparado aos estudos citados em ambos os processos extrativos empregados. De acordo com a Figura 10, o TFT do extrato do pericarpo obtido por refluxo foi equivalente a 53,51 mg de EAG.g⁻¹ extrato seco e por ultrassom o valor foi igual a 45,34 mg de EAG.g⁻¹. A diferença entre o TFT no presente estudo em relação a outros trabalhos citados pode estar relacionada a fatores como a composição química da espécie, forma de cultivo, condições climáticas e características genéticas das plantas (MELO et al., 2006; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). A incapacidade de extração exaustiva do processo por ultrassom também não pode ser descartada.

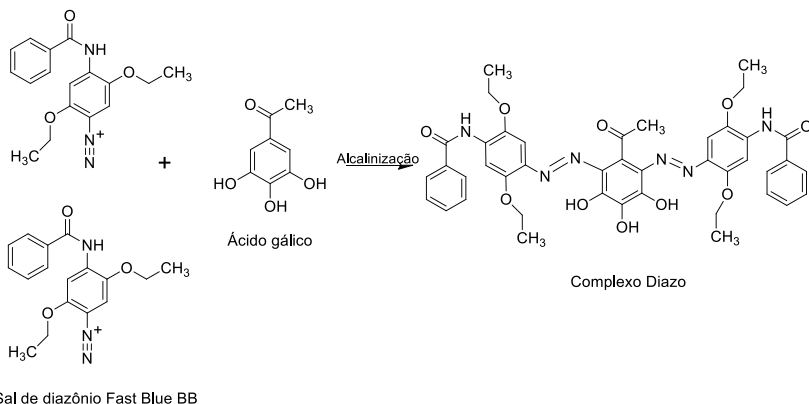
Assim, a variedade estudada de *C. chinense* Jacq. apresentou teores superiores de compostos fenólicos nos extratos metanólicos por meio de dois processos extrativos das diferentes partes do fruto (pericarpo, semente e pedúnculo) quando comparado com a literatura. Os resultados variaram de 36,38 a 68,0 mg de EAG.g⁻¹ extrato seco e podem ter sido influenciados por fatores edafoclimáticos ou ainda pelo estágio de maturação dos frutos.

5.2.2 Método de Fast Blue BB

O método do sal de diazônio Fast Blue BB é considerado simples e de rápida execução. O princípio do método consiste na ligação de compostos fenólicos com o sal de diazônio, favorecendo a formação de complexos do tipo “azo” Medina (2011a,b).

O referido sal apresenta um grupamento diazônio, o qual possui nitrogênio em sua estrutura. Este por sua vez, é retido na ligação com um grupo ativador (-OH) de compostos fenólicos. O acoplamento ocorre em soluções levemente alcalinas, considerando a capacidade de ionização dos compostos fenólicos. A reação é mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 420 nm (MEDINA, 2011a,b). A Figura 11 demonstra o acoplamento entre um composto fenólico e Sal de diazônio Fast Blue BB.

Figura 11 – Acoplamento entre um ácido gálico e o sal de diazônio *Fast Blue BB*



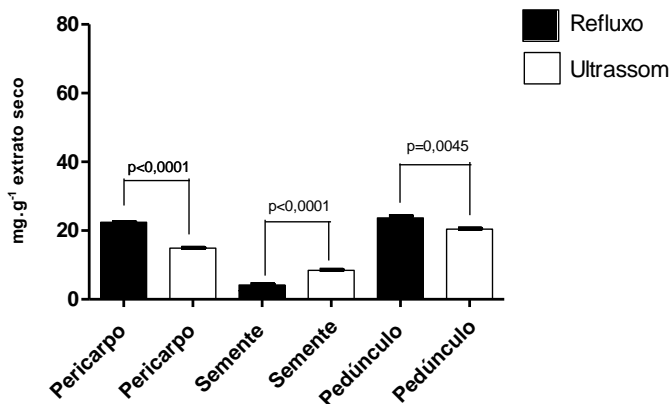
Fonte: Adaptado de Medina (2011a)

Os resultados da quantificação de compostos fenólicos pelo método de Fast Blue BB estão destacados abaixo (Figura 12).

A utilização de refluxo como processo extrativo possibilitou a obtenção de maiores teores de compostos fenólicos para o pericarpo e o pedúnculo quando comparado à extração por ultrassom. Para a semente, o método extrativo por ultrassom permitiu extrair um maior teor de fenólicos quando comparado ao método refluxo, embora as sementes tenham apresentado os menores teores de compostos fenólicos.

As estruturas que obtiveram os maiores TFT foram o pericarpo e pedúnculo (22,42 mg de EAG .g⁻¹ extrato seco e 23,71 mg de EAG .g⁻¹ extrato seco), respectivamente. Comparando-se os dois resultados, não houve diferença significativa entre os teores de fenólicos para as duas estruturas (extração por refluxo) (Teste T não pareado).

Figura 12 - TFT realizado pela técnica de Fast Blue BB. Valores de p entre as estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos. (Teste T não pareado).



5.2.3 Comparação dos TFT pelas técnicas de Folin Ciocalteu e Fast Blue BB

Os resultados encontrados para ambas as técnicas foram comparados e correlacionados, com o intuito de avaliar a eficiência dos métodos e detectar a presença de possíveis interferentes nos teores obtidos (Figura 14).

Os TFT encontrados na técnica de Folin Ciocalteu foram superiores quando comparado à técnica de Fast Blue BB. Tal diferença pode ser justificada pela quantificação de compostos interferentes na técnica de Folin Ciocalteu, tais como o ácido ascórbico, glicose, frutose e sulfitos comumente presentes em frutas e vegetais (PETERSON, 1979, 1983).

Uma correlação de Pearson entre as duas técnicas foi realizada e, de acordo com a Figura 13, os resultados indicaram uma correlação positiva e significativa entre as técnicas de Folin Ciocalteu e Fast Blue BB ($r = 0,9160$, $p < 0,0001$).

Uma possível hipótese para as divergências entre os teores de compostos fenólicos encontrados utilizando-se as duas técnicas foi que os compostos da classe dos capsaicinóides poderiam estar interferindo de modo a superestimar a quantificação pelo método de Folin Ciocalteu ou Fast Blue BB. Para eliminar ou confirmar essa hipótese, uma solução com a substância de referência capsaicina na concentração de 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi utilizada como amostra e empregada nas duas técnicas de doseamento. Os resultados encontrados indicaram um teor de 80% de fenólicos totais na solução de capsaicina para a técnica de Folin, enquanto a técnica por Fast Blue BB não detectou nenhum teor de composto na análise (Figura 14). Dessa forma, é possível inferir que os compostos da classe dos capsaicinoides podem estar superestimando os teores de fenólicos totais quando avaliado pela técnica de Folin Cioalteau.

Figura 13 – Correlação de Pearson entre os teores de compostos fenólicos totais, pelas técnicas de Folin-Cioalteau e Fast Blue BB ($r = 0,9160$; $p < 0,0001$)

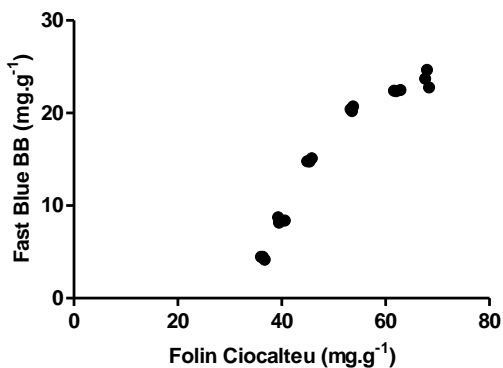
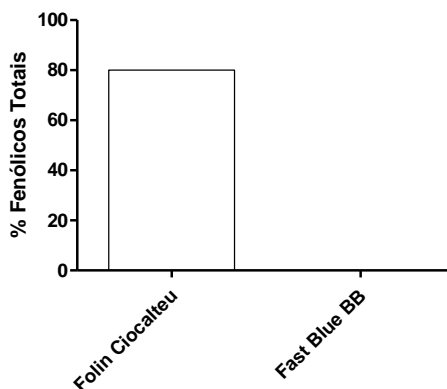


Figura 14 – Doseamento da capsaicina nas técnicas de Folin Cioalteau e Fast Blue BB

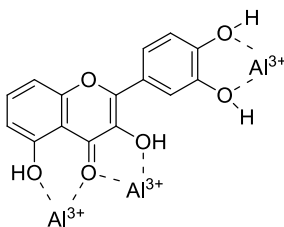


5.3 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS NAS DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE *C. chinense* Jacq.

A determinação dos teores de flavonoides totais (FT) nos extratos metanólicos das diferentes partes do fruto da variedade bode roxo foi avaliada por método colorimétrico com adaptações (MILIAUSKAS, 2004). A técnica utiliza o reagente de complexação $AlCl_3$, o qual reage com os flavonoides induzindo o surgimento de efeitos hiperacrômico e batocrômico nas amostras. A quantificação foi realizada por espectrofotometria UV-Vis em 415 nm.

O doseamento de flavonoides utilizando-se a complexação com metais é um método comumente empregado na literatura (MARKHAM, 1982; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997) e também por diversas farmacopeias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2011; FARMACOPEIA EUROPEIA, FARMACOPEIA FRANCESA, 2007.). A absorção de flavonoides na região do espectro UV-Vis ocorre devido ao deslocamento batocrômico, uma vez que os grupamentos oxigenados do flavonoide formam complexos com o Al^{3+} (Figura 15) (CORNARD; MERLIN, 2001). Além disso, a subclasse dos flavonóis formam complexos estáveis com o Al^{3+} , intensificando a cor amarela de compostos como rutina, quercetina e canferol (DENG; VAN BERKEL, 1998; POZZI, 2007).

Figura 15 – Esquema geral da complexação de flavonoides com o íon Al^{3+}

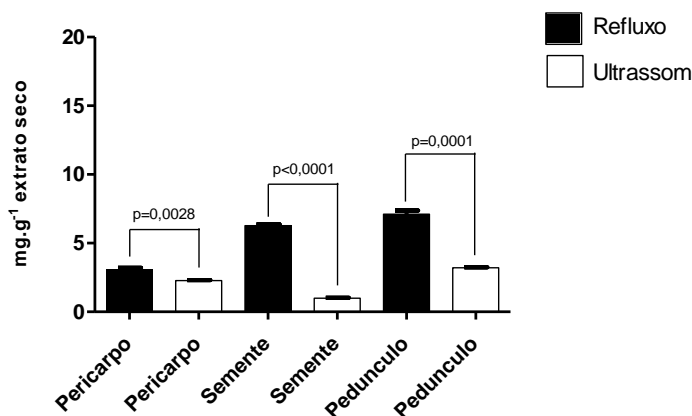


Fonte: Cornard e Merlin (2001)

Os resultados encontrados estão expressos na Figura 16. Assim como na quantificação do TFT, o método de extração por refluxo foi mais efetivo na extração de FT quando comparado ao método por ultrassom. Outro fato a ser destacado é que os maiores teores de compostos flavonoídicos foram verificados no pedúnculo e na semente. Este resultado é distinto dos teores de TFT, no qual os maiores teores foram detectados no pericarpo e pedúnculo.

De acordo com a Figura 16, o teor de FT verificados no pedúnculo e semente foram: 7,11 mg equivalente de rutina (ER) .g⁻¹ extrato seco e 6,2 mg ER.g⁻¹ extrato seco, respectivamente no emprego do método de extração por refluxo (Teste T não pareado).

Figura 16 - FT realizado pela técnica de complexação com AlCl₃. Valores de p entre as estruturas indicam diferença estatística quando comparado os dois métodos extrativos (Teste T não pareado)



Estudo realizado por Shotorbani et al. (2013), demonstrou um teor máximo de 0,075 mg de equivalentes de quercetina (EQ) por g de fruto fresco em pimentas vermelhas doces da espécie *C. annuum* L. Neste estudo, foi avaliada a influência da temperatura nos teores de flavonoides totais. Os resultados permitiram concluir que o aumento de temperatura influencia no aumento da concentração dos referidos compostos. Já Menichini et al. (2009) avaliaram os teores de flavonoides totais em extratos etanólicos de frutos imaturos e maduros na espécie *C. chinense* Jacq. variedade Habanero. Os pesquisadores detectaram teores de 1,38 mg de equivalentes de quercetina (EQ) .g⁻¹ fruto fresco para frutos imaturos, e 0,45 mg de EQ .g⁻¹ fruto fresco para frutos maduros.

Em outro estudo realizado por Loizzo et al. (2013), os teores máximos encontrados foram, respectivamente, de 4,4 e 3,7 mg de EQ .g⁻¹ de extrato seco para duas diferentes cultivares da espécie *C. annuum*. Diante dos resultados expostos foi possível inferir que os teores de flavonoides totais encontrados no presente estudo foram superiores aos teores dos estudos descritos anteriormente.

5.3.1 Comparação dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais

Visando obter uma comparação entre os teores de TFT e FT, foi plotado dois gráficos de correlação de Pearson (Figura 17) (Figura 18).

Figura 17 – Correlação de Pearson entre os teores de TFT e FT de ambos os extratos, pelas técnicas de Folin Ciocalteu e Flavonoides Totais com agente de complexação ($r = 0,9652$; $p < 0,0001$)

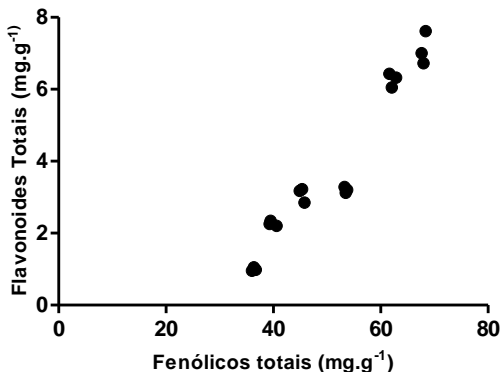
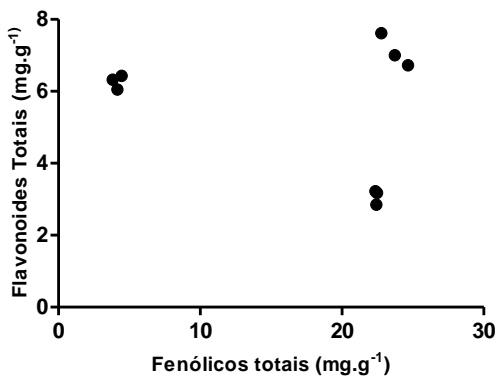


Figura 18 – Correlação de Pearson entre os teores de TFT e FT de ambos os extratos, pelas técnicas de Fast Blue BB e Flavonoides Totais com agente de complexação ($r = 0,9652$; $p < 0,0001$)



Por meio do primeiro teste foi encontrada uma correlação significava ($r = 0,9652$; $p < 0,0001$) entre os TFT analisados pela técnica

de Folin Ciocalteu e FT. Já para o segundo teste, foi encontrado uma correlação inversa entre os TFT obtidos por Fast Blue BB e os FT - 0,2632; $p < 0,001$). Este segundo resultado corrobora com os dados encontrados por Rahim e Mat (2012). Segundo esses autores, não há correlação entre os teores de TFT e FT, de três cultivares de *C. frutescens* e *C. annum*, espécies nas quais os flavonoides não se constituem os compostos majoritários que contribuem para o teor de compostos fenólicos totais.

5.4 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS NO PERICARPO DO FRUTO DE *C. chinense* Jacq.

Compostos antociânicos podem ser definidos como pigmentos solúveis em água (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009). Nesse contexto, a quantificação do referido subgrupo de compostos foi realizada somente para a estrutura do pericarpo. O teor de antocianinas foi avaliado por meio do método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Esse método é amplamente difundido uma vez que trata-se da principal técnica espectrofotométrica utilizada na quantificação de antocianinas monoméricas. Em relação às vantagens da técnica, pode-se citar o baixo custo, rapidez, e reprodutibilidade, além de não necessitar o emprego de substâncias de referência. No ano de 2005, o método do pH diferencial foi reconhecido como a metodologia oficial para a quantificação das antocianinas, sendo aprovada pela AOAC (LEE; RENNAKER; WROLSTAD, 2008).

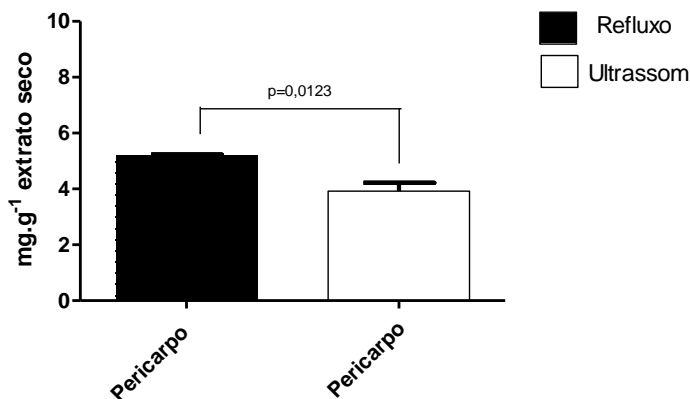
O coeficiente de absorvidade molar foi escolhido de acordo com dados descritos na literatura. Tal parâmetro é importante uma vez que a escolha equivocada pode influenciar na quantificação final dos compostos.

Em relação à massa molecular da substância de referência empregada como base para a quantificação, utilizou-se a massa da delfinidina ligada a rutinose, e a hexose (GIUSTI, WROLSTAD, 2001). Ressalta-se que a escolha delfinidina ocorreu pelo fato de que a presença da mesma já foi verificada em outras variedades do gênero *Capsicum*. Além disso, a delfinidina quando ligada a um monossacarídeo, em solução metanólica 1% HCl, apresenta coeficiente de absorvidade molar igual a 29000 (ϵ) (ASEN, et al., 1959; GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Com base nos dados citados acima para a quantificação de antocianinas monoméricas totais, os teores foram calculados, e estão apresentados na Figura 19. Os teores de antocianinas monoméricas totais obtiveram diferença significativa entre os extratos de pericarpo

obtidos por refluxo e ultrassom. Assim como na quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, o método extrativo por refluxo apresentou maior eficiência quanto à extração de antocianinas monoméricas em relação à extração por ultrassom. O teor de antocianinas monoméricas para a estrutura pericarpo (refluxo) foi de 5,22 mg.g⁻¹.

Figura 19 - Teor de antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial por refluxo e ultrassom. Valor de p indica entre as estruturas diferença significativa (Teste T não pareado).



De acordo com a literatura, o emprego de calor na extração de antocianinas pode contribuir para a degradação dos referidos compostos, favorecendo a perda de grupo acil, quebra da ligação glicosídica, ou mesmo a abertura no anel aglicona (AMR; AL-TAMIMI, 2007; KATSABOXAKIS et al., 1998). Alguns trabalhos descrevem a estabilidade na extração de antocianinas frente ao emprego de altas temperaturas (AMR; AL-TAMIMI, 2007; FAN et al., 2008; JU; HOWARD, 2003). Nesse contexto, as extrações convencionais geralmente utilizam temperaturas menores do que 70 °C, sendo a degradação dependente do tempo de extração e da temperatura. Dessa forma, torna-se possível extrair compostos antociânicos com temperaturas mais elevadas (> 70 °C), em curtos períodos de tempo de extração, uma vez que a temperatura utilizada neste estudo foi de 70°C. A associação desses dois fatores pode retardar a degradação de antocianinas em frutos (MARKAKIS, 1982; MESCHTER, 1953).

Em um estudo realizado por Ju e Howard (2003), as antocianinas foram extraídas do pericarpo de uvas utilizando-se soxhlet em um tempo de extração de 7,5 minutos em temperaturas de 60 °C e 100 °C com solvente aquoso e metanólico 60%. Os pesquisadores encontraram os maiores teores de AMT nos extratos metanólicos 60% a 100 °C, 54,56 mg.g⁻¹ peso seco, quando comparados com o extrato aquoso a 100 °C, que obteve 17,24 mg.g⁻¹ peso seco.

Apesar de matrizes distintas, o estudo de Ju e Howard (2003) corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, na qual os teores de antocianinas monoméricas totais foram superiores para o método extrativo refluxo (5,22 mg.g⁻¹ extrato). Nesse sentido, embora nos últimos anos os pesquisadores reportem o aumento logarítmico na destruição de antocianinas devido ao aumento aritmético da temperatura, períodos curtos de extração podem minimizar a degradação destes compostos e potencializar a eficiência de extração dos mesmos (MARKAKIS, 1982).

Os teores de AMT encontrados no presente trabalho para a espécie *C. chinense* Jacq. são discordantes de alguns estudos para outras espécies de *Capsicum*. Rivas et al., (2014) avaliaram o teor de AMT em extratos liofilizados de frutos de *C. pubescens*. De acordo com os dados reportados, os pesquisadores obtiveram teores de AMT igual a 0,014 mg.g⁻¹ peso seco em uma variedade amarela de *C. pubescens*. A ampla diferença entre os teores de AMT pode ser justificada pela diferença de coloração entre a espécie utilizada no estudo abordado (*C. pubescens*) e a espécie utilizada no presente trabalho (*C. chinense* Jacq.).

Já em outro estudo realizado por Sadilova, Stintzing e Carle (2006), os autores avaliaram o teor de AMT em extratos de uma variedade de pimenta violeta da espécie *C. annum* L. Os pesquisadores obtiveram 0,35 mg de AMT.g⁻¹ de fruto fresco.

Dessa forma podemos concluir que os resultados encontrados em nosso trabalho apresentam-se superiores aos estudos descritos acima.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC) ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) (Q-TOF)

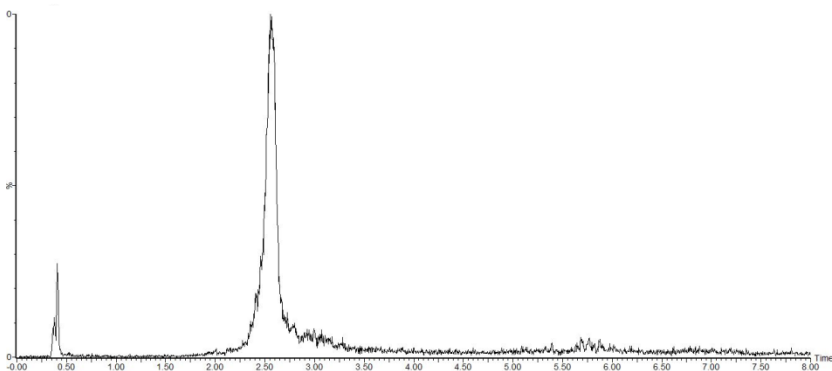
A identificação por LC-MS é uma técnica comumente empregada em diversas áreas da ciência. A técnica permite determinar a massa molar de compostos iônicos formados ou eletricamente carregados a partir de uma fonte de ionização. Os íons obtidos são analisados de acordo com a razão massa-carga (m/z), onde o m é considerado como a massa atômica unificada (u). Tal massa consiste em

1/12 da massa de um átomo do isótopo ^{12}C , sendo definido como 12 u por padronização (COLE, 1997; GROSS, 2004).

Na espectrometria de massas, o modo de ionização por elétrons é uma das formas mais usualmente empregada, uma vez que a ionização das moléculas ocorre pela retirada de um elétron e/ou pela transferência de energia, favorecendo a fragmentação das moléculas ionizadas. O espectro de massas obtido é reconhecido pela identidade da substância, uma vez que a intensidade relativa dos fragmentos gerados é dependente de cada estrutura molecular (COLE, 1997; GROSS, 2004; WHITEHOUSE, 1985). A ionização por electrospray (ESI) é uma ferramenta dentro da espectrometria de massas que favorece a formação de íons com baixa energia possibilitando a ionização de moléculas com alto e baixo peso molecular. Na ionização em modo positivo, ocorre a acidificação das moléculas, o que leva a formação de moléculas protonadas e seus contra-ânions correspondentes (WHITEHOUSE, 1985).

A análise dos extratos metanólicos do pericarpo de *C.chinense* Jacq. obtidos por refluxo e ultrassom foi realizada na concentração de 100 ug.mL^{-1} . Por meio de análise cromatográfica obteve-se duas substâncias com tempos de retenção (tr) de 2,56 e 3,40 minutos em 520 nm (Figura 20).

Figura 20 – Cromatograma representativo de ambos extratos metólicos do pericarpo de *C. chinense* Jacq.

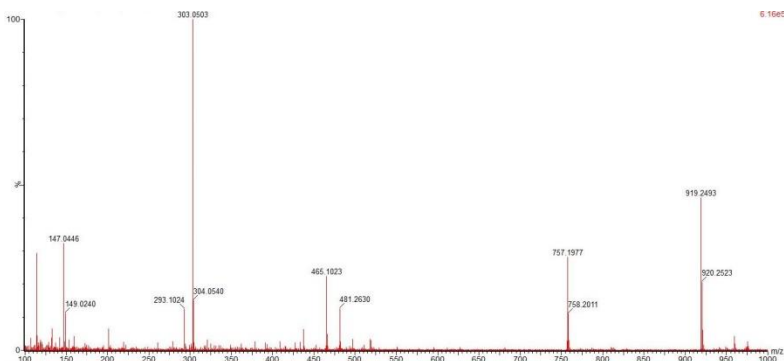


A partir dos picos obtidos, a identificação dos mesmos ocorreu por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *electrospray* em modo positivo. Os dados foram processados em

Software MassLynx v.4, obtendo-se as fórmulas moleculares $C_{42}H_{47}O_{23}$ e $C_{27}H_{31}O_{15}$, indicada pela obtenção dos cátions moleculares $[M^+]$ m/z 919,2490 (tr = 2,56 min) e 595,1672 (tr = 3,40 min), respectivamente.

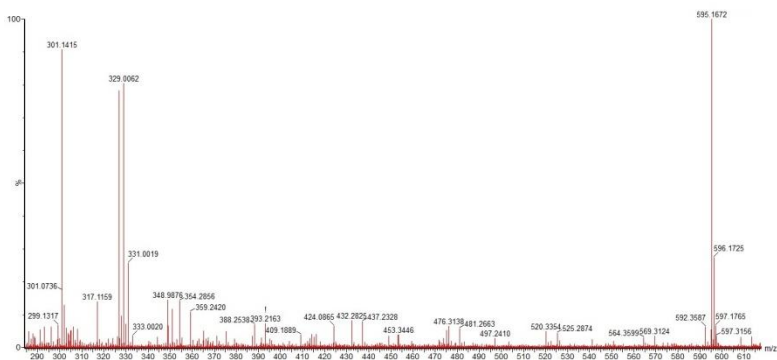
Para fórmula molecular $C_{42}H_{47}O_{23}$, a fragmentação do íon molecular $[M^+]$ com massa igual a 919,2490 (m/z) foi obtida, e os respectivos valores de massa encontrados são m/z 757,1977, 465,1023 e 303,05, de acordo com o espectro da Figura 21.

Figura 21 – Espectro de massas por ESI (+) obtido do íon molecular de massa m/z 919.2490 dos extratos metanólicos de *C.chinense* Jacq.



Em relação à molécula $C_{27}H_{31}O_{15}$, foi encontrada a fragmentação do íon molecular $[M^+]$ com massa igual a m/z 595,1672 e os valores de massa do respectivo fragmento foi m/z 301,1415 como demonstrado no espectro de massas da Figura 22.

Figura 22 – Espectro de massas por ESI (+) obtido do íon molecular de massa m/z 595,1672 dos extratos metanólicos de *C.chinense* Jacq.



De acordo com o perfil de fragmentação do primeiro espectro encontrado, os resultados foram comparados com dados provenientes da literatura. A massa molecular do cátion $[M^+]$ m/z 919,2490 e os valores dos fragmentos já foram reportados em alguns estudos de identificação de antocianinas realizados em frutos de berinjela (*Solanum melongena* L.), flores do gênero *Petúnia*, frutos da espécie *Capsicum annum* L., todas pertencentes à família Solanaceae (ANDO et al., 1999; AZA-GONZÁLEZ; OCHOA-ALEJO, 2012; GALLO; NAVIGLIO; FERRARA, 2014; ICHIYANAGI et al., 2005; SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006; TATSUZAWA et al., 2000).

Os valores da massa do íon molecular m/z 919,2490 e os respectivos fragmentos (m/z 757,1977, 465,1023 e 303,05) foram reportados no estudo realizado por Sadilova, Stintzing e Carle (2006). Neste estudo os pesquisadores analisaram extratos aceto-aquosos acidificados de berinjela (*Solanum melongena* L.) e de pimenta violeta (*C. annum* L.). Os extratos foram avaliados por ionização do tipo íon trap (modo positivo), obtendo-se os valores para o cátion molecular m/z 919, e 757, 465, 303 para os demais fragmentos. Os valores de massa encontrados no estudo condizem com a fórmula molecular $C_{42}H_{47}O_{23}$, a qual foi designada como delfinidina-3-*p*-cumaroilrutinosideo-5-glicosídeo (nasunina).

Aza-González e Ochoa-Alejo (2012), também identificaram o composto delfinidina-3-*p*-cumaroilrutinosideo-5-glicosídeo em extratos hidrometanólicos na espécie *C. annum* L. (frutos roxos). No referido trabalho, os pesquisadores analisaram os extratos com auxílio de ionizador por *nanospray*. Ademais, foi encontrado valor para o íon molecular igual a m/z 919,25, e para os fragmentos valores de m/z 757,22, 465,12 e 30,05. Os autores reportam que os dados de fragmentação para a delfinidina-3-*p*-cumaroilrutinosideo-5-glicosídeo segue a seguinte ordem: m/z 757,22 para a perda de uma glicose, m/z 465 para perda do *p*-cumaroil-ramnose e a massa m/z 303,05 referente ao núcleo aglicona.

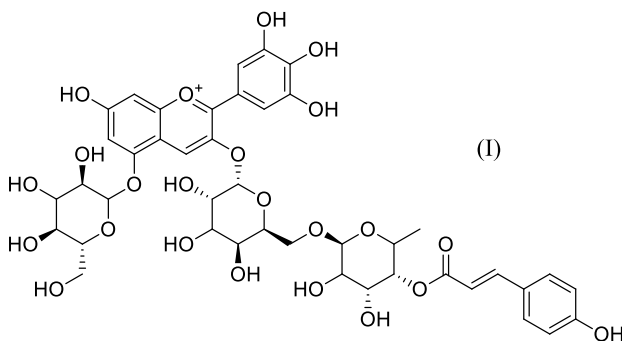
Os dados citados no estudo de Aza-González e Ochoa-Alejo (2012) corroboram com os resultados encontrados em outro estudo realizado por Lightbourn et al., (2008), os quais identificaram a antocianina delfinidina-3-*p*-cumaroilrutinosideo-5-glicosídeo por meio de LC-MS utilizando-se ionização por *electrospray*.

Provenzano et al., (2014) também caracterizaram esta antocianina em extratos de pétalas do gênero *Petunia* por meio de LC-MS com analisador do tipo íon trap e TOF em modo positivo. No estudo, os pesquisadores reportam que as massas encontradas para o íon

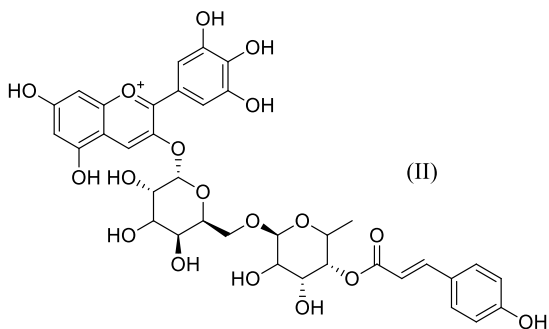
molecular e os respectivos fragmentos da molécula respectivamente foram: m/z 919,2 (íon molecular), m/z 757,2 (perda de uma unidade de glicose), m/z 465,1 (perda de *p*-cumaroil-ramnose) e m/z 303,0 (núcleo aglicona).

Diante dos estudos reportados e comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho, a estrutura química da delfinidina-3-*p*-cumaroil-5-glicosídeo (nasunina) e os fragmentos com suas respectivas massas foram elucidadas, sendo apresentado na Figura 23. O cátion molecular $[M^+]$ corresponde ao valor m/z 919,2493 (I). As posteriores fragmentações observadas correspondem à massa de m/z 757,1977 para a perda de uma glicose (II); m/z 465,1023 para a perda do *p*-cumaroil-ramnose (III), e m/z 303,05 para o núcleo aglicona delfinidina (IV). É importante salientar que a ionização por ESI utilizado no presente estudo permitiu encontrar as massas (m/z) do íon molecular e seus fragmentos com alta resolução, sendo que, o limite de precisão aceito na literatura para confirmação de composições elementares deve ser inferior a 5 ppm (BORRÁS-LINARES et al., 2015). Dessa forma, os valores de massas (m/z) encontrados neste trabalho não estão totalmente iguais aos valores citados nos estudos da literatura, possivelmente devido às condições cromatográficas empregadas, além do tipo de ionização utilizada em cada trabalho. Contudo, a diferença entre as massas encontrados neste trabalho e a massas obtidos nos estudos mencionados não são superiores a -2,2 ppm.

Figura 23 – Estrutura da antocianina majoritária e seus fragmentos nos estratos de *C. chinense* Jacq. obtido por LC-MS ionização por *electrospray*.

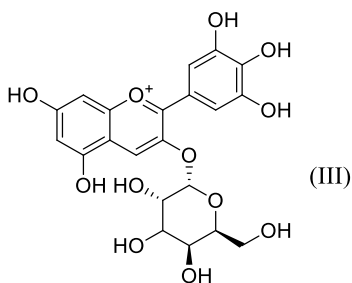


Fórmula química: $C_{42}H_{47}O_{23}$
 Massa molecular $[M^+]$: 919,2493



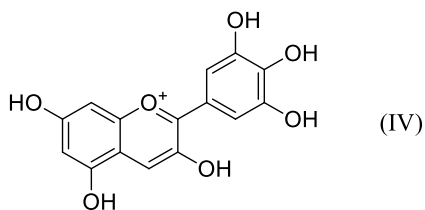
Fórmula química: $[C_{36}H_{37}O_{18}]^+$

Massa molecular $[M^+ - \text{Glucose}]$: 757,1974



Fórmula química: $[C_{21}H_{21}O_{12}]^+$

Massa molecular $[M^+ - \text{p-cumaroyl-rhamnose}]$: 465.1023



Fórmula química: $[C_{15}H_{11}O_7]^+$

Massa molecular $[M^+ - \text{Glucose-cumaroyl-rhamnose}]$:
303,0503

Em relação à massa do íon molecular $[M^+]$ m/z 595,1672 e o fragmento m/z 301,1415, os mesmos foram encontrados em estudos de

identificação de antocianinas em vegetais como o tomate (*Solanaceae*), berinjela e frutos roxos de sabugueiro, espécie do gênero *Adoxaceae* (GIUSTI et al., 1999; WU; CAO; PRIOR, 2002; WU; PRIOR, 2005).

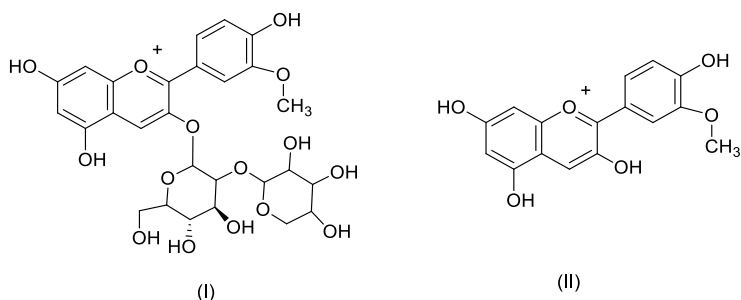
Giusti et al., (1999), reportam que a massa molecular da antocianidina peonidina é igual a m/z 301, e quando a mesma está ligada a uma hexose e pentose apresenta a massa molecular m/z 595,2. Esses dados corroboram o estudo realizado por Wu et al (2002), os quais identificaram a antocianina peonidina-3-sambubiosídeo. O íon molecular encontrado pelos autores correspondeu a m/z 595,9 e o respectivo fragmento de massa m/z 301,2.

Aza-González e Ochoa-Alejo (2012), caracterizaram a antocianidina peonidina em uma cultivar de pimenta mexicana oriunda da espécie *C. annum* L. No entanto, a caracterização foi realizada por CLAE-DAD, utilizando-se substância de referência. Tal informação é relevante uma vez que a aglicona peonidina foi reportada no estudo citado, o que corrobora com os resultados aqui apresentados.

Em relação ao dissacarídeo sambubiose (2-O- β -D-xilosil-D-glicose), o mesmo pode apresentar-se ligado aos núcleos das antocianidinas cianidina e pelargonidina. Tal fato foi reportado em um estudo realizado por Wu e Prior (2005), os quais identificaram e caracterizaram antocianinas com auxílio de fonte de ionização por *electrospray* em vegetais e grãos. Segundo os autores foram identificadas as antocianinas cianidina-3-sambubiosídeo e pelargonidina-3-sambubiosídeo.

De acordo com as informações reportadas da literatura e os dados encontrados em nossas análises, foi possível obter a fórmula molecular $C_{27}H_{31}O_{15}$. Tal informação corrobora com os dados informados sobre a massa do íon molecular m/z 596,1672 (I), sugerindo tratar-se da peonidina-3-sambubiosídeo e seu fragmento m/z 301,0223, o qual corresponde ao núcleo peonidina (II). A estrutura molecular e o referido fragmento são apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Estrutura química peonidina-3-sambubiosídeo e o núcleo fundamental



Fórmula química: $C_{27}H_{31}O_{15}$
 Massa molecular $[M^+]$: 595,1672

Fórmula química: $[C_{16}H_{13}O_6]^+$
 Massa molecular $[M^+ - \text{Sambubiosídeo}]$: 301,0723

5.6 TEORES DE CAPSAICINA E DIHIDROCAPSAICINA NO PERICARPO E SEMENTE DE *C. chinense* Jacq.

A análise dos teores de capsaicina e dihidrocapsaicina foi realizada nos extratos metanólicos obtidos por refluxo e ultrassom, somente para as estruturas do pericarpo e semente. Para a estrutura pedúnculo, a quantificação não foi viável, uma vez que os picos referentes aos dois capsaicinoides não foram detectados na metodologia empregada para a quantificação. Esse resultado pode estar relacionado à produção dessa classe de compostos, a qual ocorre no interior dos frutos, em órgãos como a placenta, e difundindo-se por meio das sementes e pericarpo. Por ser uma estrutura externo ao fruto, o pedúnculo provavelmente não apresenta os capsaicinoides em sua parede vegetal. As condições cromatográficas empregadas para a quantificação dos dois capsaicinoides são provenientes de método analítico desenvolvido por Bortolin (2013).

De acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras 25, 26, 27, 28 é possível observar a presença de 2 compostos majoritários, sendo o primeiro pico (1) a capsaicina com tempo de retenção de 13,25 min, e o segundo pico (2) a dihidrocapsaicina, apresentando tempo de retenção de 18,48 min. Os referidos compostos foram identificados com base na comparação dos tempos de retenção, dos espectros de absorção UV-Vis e pela co-injeção com as respectivas substâncias de referência.

O perfil qualitativo das análises da capsaicina e dihidrocapsaicina permaneceu o mesmo, diante das duas estruturas avaliadas (pericarpo e semente) em ambos os processos extrativos.

Figura 25 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por refluxo da estrutura pericarpo de *C. chinense* Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280 nm

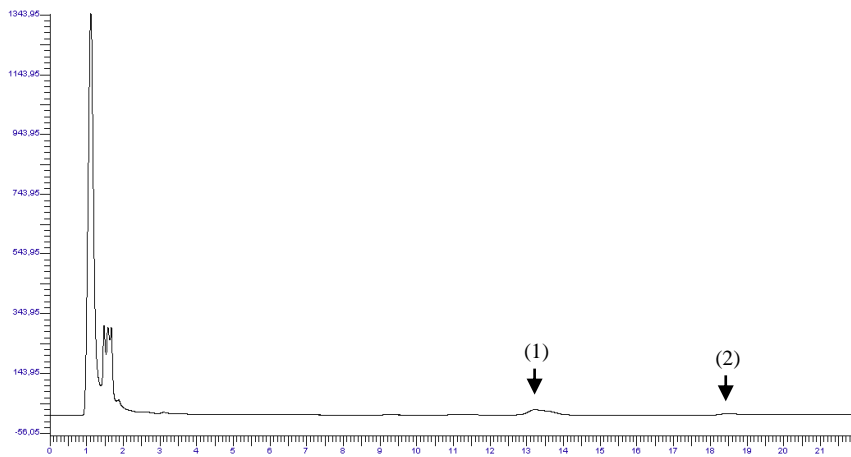


Figura 26 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por refluxo da estrutura semente de *C. chinense* Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280 nm

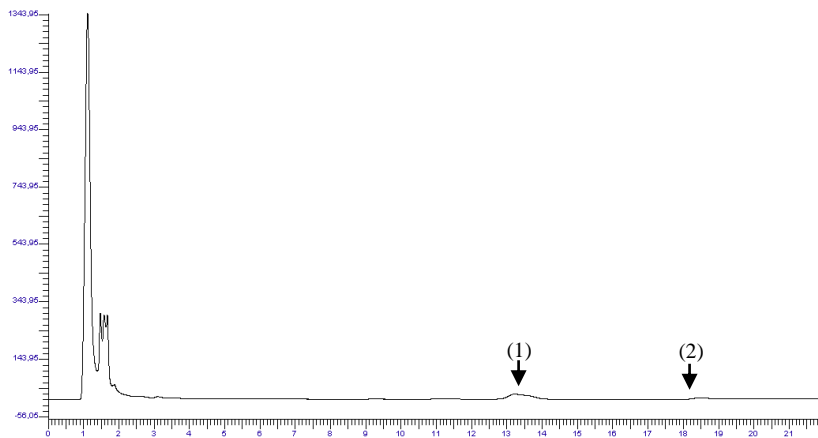


Figura 27 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por ultrassom da estrutura pericarpo de *C. chinense* Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280 nm

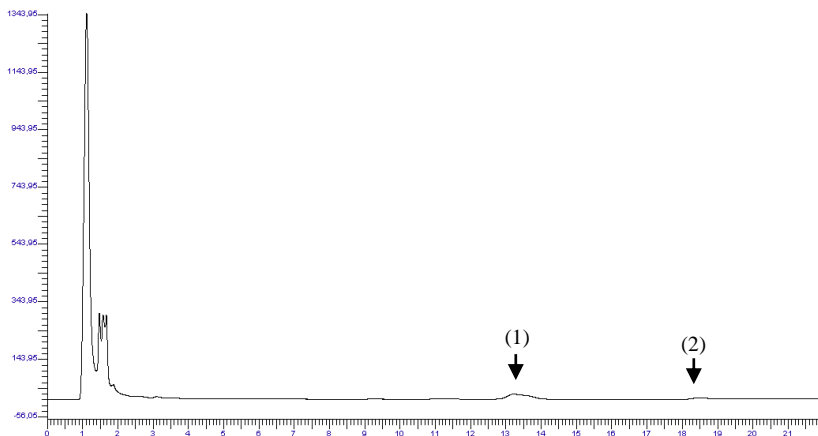
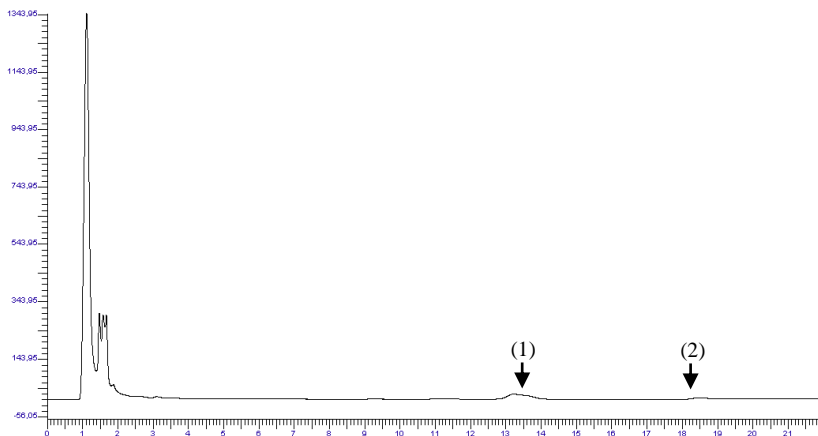


Figura 28 – Cromatograma obtido do extrato metanólico por ultrassom da estrutura semente de *C. chinense* Jacq. por CLAE/UV-Vis com detecção por 280 nm



Os extratos metanólicos obtidos por refluxo e ultrassom foram avaliados, e os teores de capsaicina e dihidrocapsaicina foram calculados individualmente, para a estrutura do pericarpo e semente (Tabela 1).

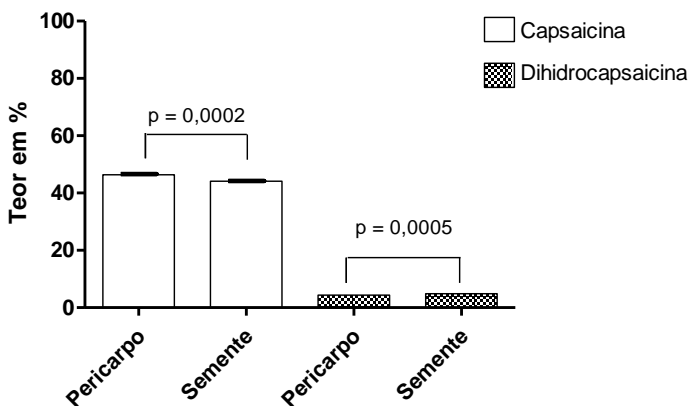
Tabela 1 – Teores de capsaicina e dihidrocapsaicina determinados por CLAE nas estruturas pericarpo e semente

Teor*	Extrato MeOH 70% - Refluxo		Extrato MeOH 70% - Ultrassom	
	Pericarpo	Semente	Pericarpo	Semente
Capsaicina	2,83 ± 0,02	2,71 ± 0,08	5,38 ± 0,08	2,42 ± 0,06
Dihidrocapsaicina	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,55 ± 0,02	0,21 ± 0,07

*Valores expressos em mg. g⁻¹ de extrato seco

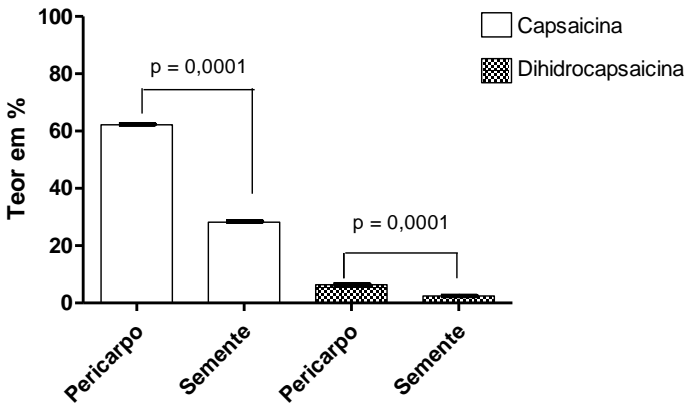
Os teores de capsaicina encontrados nos extratos obtidos por refluxo para a estrutura do pericarpo e semente variam entre 46, 31% e 44,35%, respectivamente, apresentado diferença significativa. Para o teor de dihidrocapsaicina, os mesmos encontram-se entre 4,41% na estrutura do pericarpo, e 4,9 % na estrutura semente, com diferença significativa (Figura 29). Dessa forma, é possível inferir que o teor de capsaicina encontra-se em média dez vezes superior ao teor de dihidrocapsaicina para as duas estruturas vegetais analisadas.

Figura 29 - Gráfico demonstrando o teor relativo de cada capsaicinoide presente no extrato obtido por refluxo no pericarpo e semente de *C. chinense* Jacq. Valores de p indicam diferença significativa entre os teores (Teste T não pareado).



Nos extratos obtidos por ultrassom, os teores de capsaicina encontrados na estrutura do pericarpo e semente apresentam-se entre 62,1% e 28,0%, respectivamente (diferença significativa). Em relação aos teores de dihidrocapsaicina, os mesmos encontram-se entre 6,42% para a estrutura pericarpo e 2,45% para estrutura semente (diferença significativa) (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico demonstrando o teor relativo de cada capsaicinoide presente no extrato obtido por ultrassom no pericarpo e semente de *C. chinense* Jacq. Valores de p indicam diferença significativa entre os teores (Teste T não pareado).



Os resultados encontrados no presente trabalho são compatíveis com os teores obtidos no estudo realizado por Supalkova et al. (2007). No referido estudo, os pesquisadores avaliaram apenas o teor de capsaicina em frutos da variedade do gênero *Capsicum*. Os teores encontrados foram de 38,03% de capsaicina para estrutura pericarpo e 1,64% de capsaicina nas sementes. Os autores reportam que os menores teores de capsaicinoides estão geralmente na estrutura semente, e que dependendo do tipo de fruto, os teores de capsaicinoides podem não estar distribuídos uniformemente. Além disso, a técnica utilizada no estudo empregou CLAE com detector eletroquímico, pode ter contribuído para resultados superiores nos teores de capsaicina considerando a sensibilidade do detector utilizado.

É importante destacar, porém, que existem estudos controversos na literatura. Kozukue et al. (2005) avaliaram os teores de capsaicina e dihidrocapsaicina em três estruturas de uma variedade vermelha picante

de *C. annuum*. Os autores reportam que os teores de capsaicina (30,41%) e dihidrocapsaicina (10,18%) encontrados na semente foram superiores aos teores de capsaicina (18,67%) e dihidrocapsaicina (8,83%) encontrados na estrutura do pericarpo. É importante destacar, que os valores em percentual foram calculados com base apenas nos teores totais de capsaicina e dihidrocapsaicina para as estruturas utilizadas (pericarpo e semente).

Outro estudo realizado por Sharma, Chinn e Boyette (2015) corrobora os resultados obtidos por Kokuzue et al. (2005). Os pesquisadores determinaram os teores de capsaicina e dihidrocapsaicina nas estruturas do pericarpo e semente de frutos da variedade Habanero (*C. chinense*), por CLAE-UV. De acordo com os autores, os resultados foram de 28,7% (pericarpo) e 48,2% (semente) para o teor de capsaicina. Em relação ao teor de dihidrocapsaicina, os teores encontrados foram de 6,8% (pericarpo) e 16,1% (semente).

As divergências dos resultados podem ser discutidas com base na produção dos capsaicinoides, os quais ocorrem na estrutura da placenta (maiores teores). O fato das sementes apresentarem maiores teores de capsaicinoides em comparação ao pericarpo nos estudos de Kokuzue et al. (2005) e Sharma, Chinn e Boyette (2015), o que pode ser justificado pela localização das sementes, as quais em alguns frutos do gênero *Capsicum* estão intimamente ligadas à estrutura da placenta. Além disso, o extravasamento e a difusão dos capsaicinoides pode conferir a diminuição dos teores no sentido placenta, semente e pericarpo respectivamente (ESTRADA et al., 2002; KOZUKUE, 2005; McGEE, 2007; SUZUKI; IWAI, 1984). Entretanto, em relação aos resultados do presente estudo, o maior teor de capsaicinoides verificado no pericarpo pode estar relacionado com a variedade da espécie, forma e a coloração.

Diante dos resultados encontrados na caracterização química, está demonstrado na tabela abaixo um resumo dos resultados encontrados para a análise dos compostos, observando-se que para a maioria das técnicas o processo extrativo refluxo foi mais eficiente (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados dos teores em mg.g⁻¹ encontrados na avaliação do perfil químico nos extratos metanólicos obtidos por refluxo e ultrassom

COMPOSTOS ANALISADOS	Refluxo			Ultrassom		
	Pericarpio	Semente	Pedúnculo	Pericarpio	Semente	Pedúnculo
Fenólicos Totais (Folin-Ciocalteu*)	53,51	36,74	68,33	45,77	40,60	62,15
Fenólicos Totais (Fast Blue BB*)	22,47	4,46	24,66	15,10	8,57	20,40
Flavonoides Totais (AC ₁ s)	3,22	6,43	7,50	2,35	1,05	3,20
Antocianinas (pH diferencial)	5,22	-	-	4,40	-	-
Teor de capsaicinoides (CLAE)	3,16	3,01	-	5,85	2,62	-

*Exceto sementes - método extrativo por ultrassom mostrou-se mais eficaz

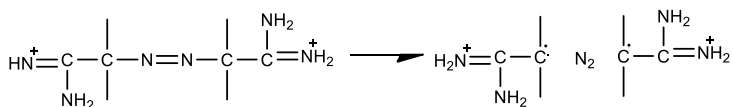
5.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Em razão dos resultados encontrados na caracterização química dos extratos metanólicos de *C. chinense* Jacq. (Pimenta bode-roxo), foi decidido prosseguir somente os extratos metanólicos obtidos por refluxo. Essa escolha se deve ao fato de que na maioria das técnicas empregadas para a avaliação do perfil químico, a extração por refluxo apresentou os maiores teores dos compostos químicos analisados.

5.7.1 Avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP)

A determinação do TRAP foi realizada empregando-se o método que consiste na quantificação da intensidade da quimiluminescência gerada pela reação de termólise entre radicais peroxilas e o luminol (LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992; LISSI et al., 1995). Com a decomposição térmica do composto hidrofílico “azo” (AAPH) ocorre a formação de radicais peroxilas (Figura 31), os quais reagem com o luminol adicionado ao meio de reação. A luminescência produzida é diretamente proporcional à concentração desses radicais. Nesse contexto, os compostos antioxidantes quando adicionados ao sistema de reação em solução tampão promovem a captura dos radicais peroxilas formados. Tal consequência leva a diminuição da quimiluminescência, sendo proporcional a capacidade antioxidante da amostra (LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992).

Figura 31 – Termólise da estrutura química do AAPH, gerando dois radicais alquil e nitrogênio.



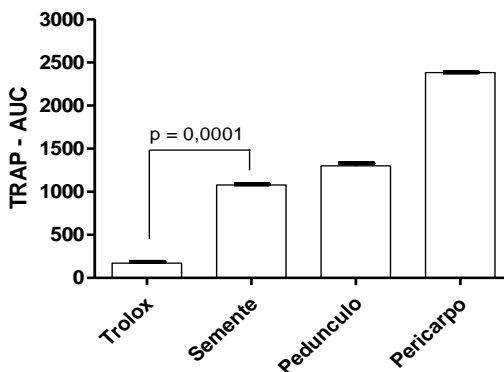
Fonte: Adaptado de Krasowska al., (2000)

O TRAP foi determinado visando avaliar a capacidade de sequestro dos radicais durante um determinado período de tempo. O referido método tem sido rotineiramente empregado nos últimos anos com esse fim, por ser uma técnica sensível, simples e reproduzível. Além disso, o TRAP possui a vantagem de determinar a capacidade antioxidante em misturas complexas como, por exemplo, extratos vegetais (DESMARCHELIER et al., 1997).

No TRAP, quando a perda da quimiluminescência se estende ao longo do tempo, o valor de área sob a curva (AUC) é baixo. Quanto menor o valor de AUC, maior a atividade antioxidante dos extratos (MORESCO, 2013).

Os resultados foram obtidos a partir da adição dos extratos na concentração de 100 µg.ml⁻¹ e do controle trolox na concentração final de 200 nM. Os valores para o TRAP foram expressos em AUC (Figura 32).

Figura 32 – Valores do potencial antioxidante reativo total (TRAP) foram plotados no gráfico em valores de AUC. Valor de p indica diferença significativa (Test T não pareado)



No decorrer da análise do TRAP, em um tempo total médio de 120 minutos, todos os extratos obtidos por refluxo demonstraram potencial atividade antioxidante *in vitro* (Figura 32). No entanto, a estrutura que obteve o melhor resultado frente à captura dos radicais formados foi a semente.

Por outro lado, o índice TAR está relacionado à adição da amostra ao sistema luminol-AAPH. Dessa forma, o decréscimo inicial da quimiluminescência representa, portanto, a qualidade antioxidante total de todos os compostos antioxidantes presentes na amostra (LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992).

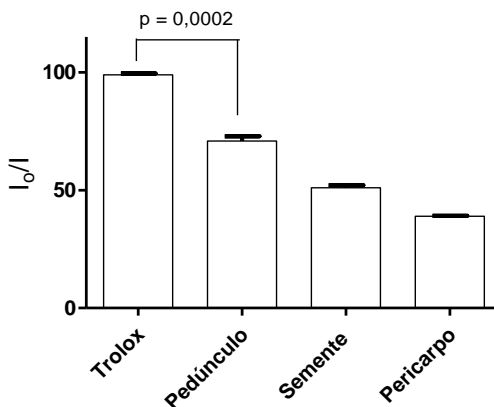
Em relação aos resultados de TAR, os mesmos estão representados na Figura 33. Os valores de TAR foram expressos na razão I_0/I , o que representa o decaimento inicial da quimiluminescência, quando os extratos das diferentes estruturas são adicionados. Os resultados do índice TAR indicaram que todos os extratos apresentaram reatividade antioxidante inicial.

Embora os resultados visualizados no TRAP revelem que o extrato da semente apresentou o melhor perfil de captura dos radicais durante tempo total médio da técnica, os resultados obtidos no cálculo índice TAR não corroboram tal fato visto que, a estrutura que obteve um melhor perfil de reatividade inicial foi o pedúnculo, quando comparado ao trolox (Figura 33). Esse fato pode ser explicado pela presença de compostos fenólicos totais, uma vez que a estrutura pedúnculo apresentou os maiores teores desta classe de compostos.

Ciz et al., (2010), concluíram que pimentas do gênero *Capsicum* com elevados teores de compostos fenólicos apresentaram potencial antioxidante superior quando comparado a vegetais (tomate e cenoura) com baixos teores de fenólicos.

A diferença do perfil antioxidante das diferentes estruturas do fruto verificada no TRAP e TAR pode decorrer devido à presença de diferentes classes de compostos. É importante ressaltar que na estrutura do pedúnculo, não foi possível a quantificação de compostos capsaicinoides. Já para a estrutura da semente, foi quantificada a presença desses compostos. Assim os capsaicinoides poderiam ser os responsáveis pela captura dos radicais ao longo de 120 minutos. Kappel et al., (2007) avaliaram o TRAP em frutos não pungentes maduros da espécie *C. baccatum* var. *pendulum*. De acordo com os autores, foi possível concluir que os extratos etanólicos da estrutura semente demonstraram o melhor perfil de captura de radicais, quando comparado às outras estruturas (pericarpo e placenta).

Figura 33 – Valores da perda inicial de quimiluminescência (TAR), expressos em I₀/I. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado)



Para verificar a relação entre o potencial antioxidante e a presença de compostos fenólicos, capsaicinoides e flavonoides, foi empregado o teste de correlação de Pearson (Tabela 3). Essa correlação foi avaliada pelos valores do índice TAR e os teores de compostos.

Em relação à classe de compostos fenólicos, foi possível estabelecer uma correlação significativa positiva entre os teores de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante na técnica empregada (Tabela 3). Tal resultado corrobora com os achados de Kappel et al., 2007, trabalho no qual os autores obtiveram uma correlação significativa positiva entre os teores de compostos fenólicos presentes nos extratos das estruturas dos frutos maduros e a capacidade antioxidante ($r = 0,863$). Além disso, os resultados aqui obtidos são semelhantes aos detectados por Ciz et al., (2010), os quais determinaram uma correlação significativa positiva entre os teores de compostos fenólicos e o potencial antioxidante detectado ($r = 0,970$).

Para os capsaicinoides, a correlação mensurada foi significativamente negativa. Assim, pode-se inferir que a perda inicial da quimiluminescência (índice TAR) não está relacionada com a concentração de capsaicinoides, visto que, o melhor valor de índice TAR foi para a estrutura pedúnculo, o qual não contém capsaicinoides.

Esses resultados não estão de acordo com Moresco (2013). No referido trabalho, a correlação entre os capsaicinoides e potencial antioxidante inicial foi significativa e positiva para a variedade cheiro comum (*C. chinense* Jacq.).

Tabela 3 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre TAR e os teores de fenólicos, flavonoides totais, capsaicina e dihidrocapsaicina totais dos extratos das três estruturas de *C. chinense* Jacq.

	Fenólicos totais	Flavonoides totais	Capsaicinoides totais
TAR	0,8935*	0,8042*	-0,9594*

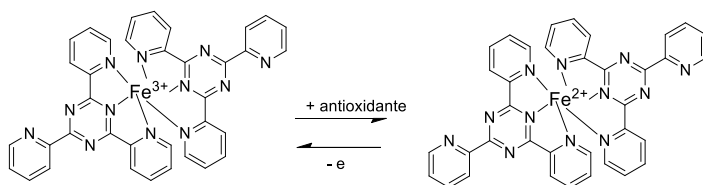
^a – Potencial antioxidante reativo total

* correlação significativa - $p < 0,05$

5.7.2 Determinação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP)

A avaliação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) foi realizada segundo metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). A técnica consiste na redução do complexo Fe (TPTZ)₂³⁺, para a forma íon ferroso (Fe²⁺), envolvendo a doação de elétrons por agente antioxidante (Figura 34). Metais de transição, na forma de íon podem favorecer a peroxidação lipídica endogenamente, gerando radicais livres por meio da reação de Fenton. Tal processo leva à decomposição de lipídios formando radical peroxilas (SIM; SIL, 2008). Nesse contexto, buscar compostos antioxidantes que favoreçam a redução de metais de transição torna-se relevante.

Figura 34 – Reação de transferência de elétrons por agente redutor (antioxidante)



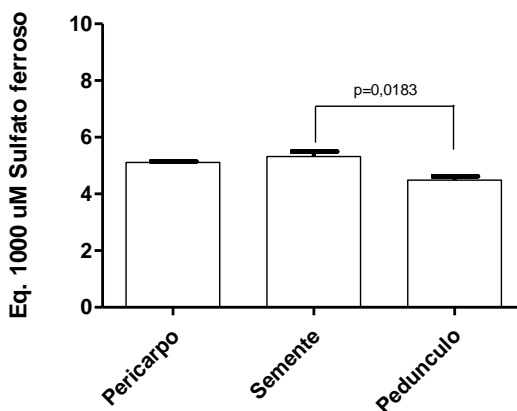
Fonte: Adaptado de Shalaby e Shanab (2013)

A técnica do FRAP tem sido comumente empregada para a avaliação do poder antioxidante de substâncias isoladas e misturas complexas. Trata-se de um método reprodutível e simples, o qual pode

ser utilizado para o estudo da atividade antioxidante em alimentos, extrato e bebidas. Além disso, estudos tem avaliado o poder antioxidante de polifenóis utilizando a referida técnica (GOUVEIA-FIGUEIRA; CASTILHO, 2015; PULIDO; BRAVO; SARA-CALIXTO, 2000). Em contraponto, alguns autores inferem que a utilização da técnica do FRAP não é totalmente confiável quando se deseja avaliar a capacidade antioxidante total das amostras. Ademais, espécies redutoras que possuem o grupamento SH (tióis), como a glutatona e proteínas, não possuem o poder de redução do íon oxidativo devido à demora da reação de redução, podendo subestimar os resultados (OU et al., 2002; PULIDO; BRAVO; SARA-CALIXTO, 2000).

Em relação aos resultados obtidos para a técnica de FRAP, os mesmos foram plotados no gráfico da Figura 35. Os resultados foram expressos em equivalentes a 1000 μM de sulfato ferroso por miligrama de amostra. (Eq. 1000 μM SF. mg^{-1}).

Figura 35 – Resultados obtidos dos extratos metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie *C. chinense* Jacq para o método do FRAP. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado)



De acordo com os resultados encontrados nos três extratos obtidos por refluxo (10 mg.mL^{-1}), todos apresentaram poder antioxidante de redução do íon Fe^{3+} à íon Fe^{2+} .

As estruturas que obtiveram a melhor capacidade de redução íon (Fe^{3+}) foram a semente e o pericarpo ($5,32 \text{ Eq. } 1000 \mu\text{M SF. mg}^{-1}$ e $5,12 \text{ Eq. } 1000 \mu\text{M SF. mg}^{-1}$), respectivamente, não apresentando diferença significativa entre as mesmas. Já a estrutura do pedúnculo,

apresentou o menor poder de redução do (Fe^{3+}) quando comparado às outras duas estruturas de pimenta *C. chinense* Jacq.

Os resultados encontrados para o FRAP no presente trabalho, o qual avaliou extratos de diferentes estruturas da espécie estudada, foi visualizado em outro estudo realizado por Loizzo et al., (2015). No referido estudo, os autores avaliaram o FRAP em quatro diferentes espécies de pimenta (*C. annumm*, *C. baccatum*, *C. chacoense* e *C. chinense*) a partir de extratos aquosos do fruto inteiro. A espécie que obteve os melhores resultados frente ao poder antioxidante de redução do íon férrico foi *C. annumm*. Além disso, os pesquisadores reportam por meio de uma análise de correlação, que os principais contribuintes para a atividade na técnica empregada seriam os compostos fenólicos e flavonoides.

Além dos resultados já descritos acima, no presente trabalho foi realizada uma análise de correlação entre o FRAP e os teores de fenólicos, flavonoides e capsaicinoides (teste de correlação de Pearson). Foi possível observar uma correlação significativa negativa entre os teores de fenólicos, flavonoides e capsaicina e o FRAP (Tabela 4). Entretanto para a dihidrocapsaicina obteve-se uma correlação positiva. A correlação negativa infere que o aumento dos teores dos compostos analisados não influencia no aumento do potencial antioxidante de redução do íon Fe^{3+} . Tal fato não corrobora o estudo de Deepa et al., (2007), onde os pesquisadores avaliaram frutos de genótipos de *C. annumm*, e encontraram uma correlação positiva ($r = 0,573$) entre os teores de fenólicos e a técnica do FRAP. Contudo, é importante salientar que os autores não avaliaram as estruturas dos frutos separadamente.

Viktorija et al., (2014), também avaliaram cultivares de pimentas a partir de extratos etanólicos obtidos por maceração utilizando-se a técnica do FRAP. Os autores verificaram que o aumento da concentração de capsaicina nos extratos influenciou positivamente o potencial antioxidante, (correlação positiva, $r = 0,998$). Somado a isso, Sadilova, Stinzing e Carle (2006) propuseram em seu trabalho a análise de extratos provenientes de frutos de pimenta violeta (*C. annumm* L.) frente à técnica do FRAP. Os pesquisadores relacionaram a presença de antocianinas identificadas por LC-MS e quantificadas por método do pH diferencial com atividade antioxidante na referida técnica. Segundo alguns autores, a atividade antioxidante das antocianinas esta relacionada à sua estrutura química principalmente devido à função do grupo catecol presente no anel-B (KIM; LEE, 2004; SADILOVA; STINTZING; CARLE, 2006). Além disso, o tipo de glicosilação e

acilação podem contribuir para o aumento da atividade antioxidante (STINTZING et al., 2002).

Tabela 4 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método FRAP e os teores de compostos fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais de pericarpo, semente e pedúnculo de *C. chinense* Jacq.

	Fenólicos totais	Flavonoides totais	Capsaicina	Dihidrocapsaicina
FRAP ^a	-0,7419*	-0,2378	-07331	0,7007

^a – Poder antioxidante redutor de ferro

*p < 0,05 (correlação significativa)

5.7.3 Avaliação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) via redução do azul de Nitrotetrazólio (NBT)

Os mecanismos que envolvem a captura de radicais livres em vegetais dispõem de diferentes enzimas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD). As SODs dismutam o $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 e se localizam principalmente nas mitocôndrias e nos cloroplastos, compartimentos que geram a maior parte das EROs nas células vegetais (APEL; HIRT, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A determinação da atividade da SOD foi avaliada por meio da redução do azul de Nitrotetrazólio (NBT). Esse método foi avaliado de acordo com Beyer e Fridovich (1987) e tem como princípio a redução de O_2 a $O_2^{\cdot -}$ com conseqüente redução do composto NBT a outro composto insolúvel de cor roxa (formazan).

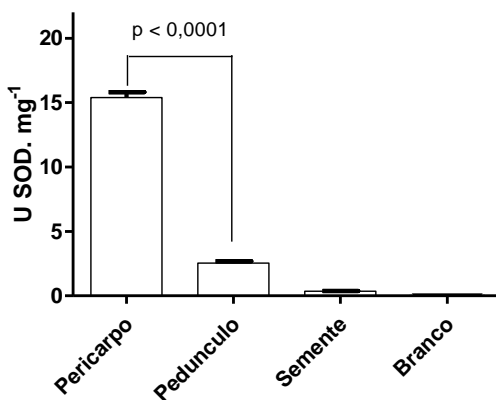
No gráfico da Figura 36, é possível visualizar os resultados encontrados após a realização da técnica. Ressalta-se que para a execução da mesma, foram utilizados extratos das diferentes partes do fruto na concentração de 1 mg.mL^{-1} . De acordo com o resultado é possível observar que a estrutura pericarpo e pedúnculo demonstraram capacidade de reduzir o composto NBT à formazan. Entretanto, a atividade de SOD verificada para o pericarpo foi superior quando comparada ao pedúnculo. Já a estrutura semente, não apresentou atividade da enzima SOD. Esses resultados sugerem que as estruturas pericarpo e pedúnculo apresentam de SOD.

Chen et al. (2012), demonstraram que extratos obtidos do pedúnculo de *C. annuum*, apresentaram melhor potencial de atividade da SOD em relação as estruturas pericarpo e placenta. Tal resultado não

corroborar o presente estudo, uma vez que o extrato obtido a partir do pericarpo apresentou maior resultado frente à atividade da SOD quando comparado a estrutura pedúnculo.

Por outro lado, Sim e Sil (2008) avaliaram a atividade da SOD em extratos etanólicos do pericarpo e semente da espécie *C. annuum*. Os autores obtiveram um percentual mais elevado para a atividade da SOD em extratos do pericarpo em relação a extratos de semente, sendo que para as duas estruturas a atividade da SOD foi maior nas concentrações mais elevadas dos extratos.

Figura 36 – Resultados obtidos dos extratos metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie *C. chinense* Jacq. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado)



Para averiguar a correlação entre os principais compostos presentes nas estruturas pedúnculo e pericarpo, e a atividade da enzima SOD foi empregado o teste de correlação de Pearson (Tabela 5). De acordo com os resultados é possível visualizar que o teor de compostos fenólicos e flavonoídicos demonstraram um índice de correlação negativo em relação à atividade da enzima SOD, ao contrário dos estudos de Chen e Kang (2013). Na ocasião, os autores propuseram uma correlação positiva forte ($r = 0,92$) entre o teor de compostos fenólicos das estruturas pedúnculo e pericarpo e placenta, de *C. annuum* L. com a atividade da referida enzima. Por outro lado, o índice de correlação entre antocianinas e atividade da enzima SOD foi positiva (0,5607).

Tabela 5 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método SOD e os teores de compostos fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais de pericarpo, semente e pedúnculo de *C. chinense* Jacq.

	Fenólicos totais	Flavonoides totais	Antocianinas Totais
SOD ^a	-0,9971*	-0,9914*	0,5607

^a – Atividade superóxido sismutase

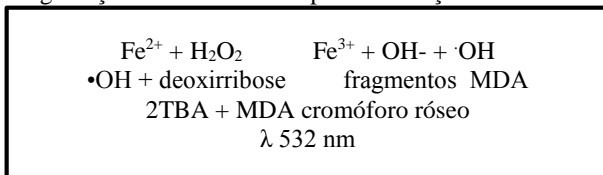
* $p < 0,05$ (correlação significativa)

5.7.4 Avaliação da capacidade de captura do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

O radical hidroxil é considerado o mais reativo entre as ROS e é formado a partir do ânion superóxido e H_2O_2 na presença íons metálicos. O radical formado pode reagir com lipídios, polipeptídios, proteínas e com moléculas de DNA, promovendo danos celulares que podem ser irreversíveis (LEE et al., 2004).

A atividade de captura do $\cdot\text{OH}$ foi determinada empregando-se método *in vitro*, o qual avalia a formação desse radical a partir do ensaio de degradação oxidativa da 2-deoxirribose (2-DR) (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999). O método se baseia na incubação da 2-DR com um sistema gerado de radical hidrol. A 2-DR sofre degradação formando o malondialdeído (MDA), o qual se condensa com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando produto final de cor rósea. O produto é mensurado por espectrofotometria em comprimento de onda de 532 nm (Figura 37). Dessa forma, a referida técnica tem por objetivo medir a atividade antioxidante das substâncias frente ao radical hidroxil. Entretanto, postula-se que outras espécies reativas de oxigênio também poderiam promover a degradação da deoxirribose (HALLIWELL; GUITERIDGE, 1999).

Figura 37: Degradação da deoxirribose a partir da reação de Fenton

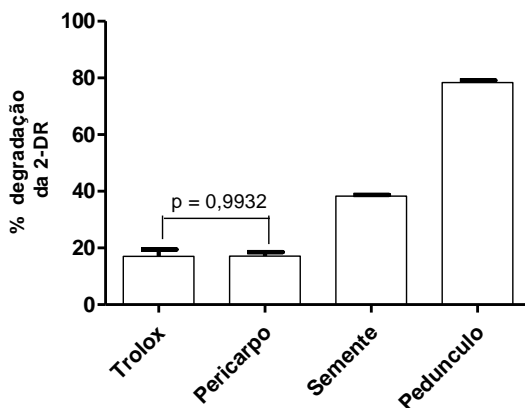


Fonte: Adaptado de Halliwell e Guiteridge (1999)

Dentre os três extratos avaliados (10 mg.mL^{-1}), somente o extrato do pericarpo não apresentou diferença significativa em comparação ao trolox para a captura do radical hidroxil. Sendo assim, pode-se inferir que a estrutura pericarpo apresenta a melhor capacidade de prevenção da degradação da 2-DR quando comparado aos extratos das outras estruturas. Ainda, de acordo com o gráfico da Figura 38, os valores em percentual da degradação da 2-DR para estruturas pericarpo, semente e pedúnculo foram respectivamente, 17,08%, 38,26% e 78,35%.

A correlação encontrada para os principais metabólitos presentes nas estruturas pericarpo, pedúnculo e semente e a inibição da degradação da deoxirribose pode ser verificada na Tabela 6. Os índices de correlação encontrados indicam que tanto os compostos fenólicos quanto os flavonoides apresentam uma correlação positiva com a atividade antioxidante. Esses resultados indicam que o potencial de captura do radical hidroxil pode ser exercido pelos compostos fenólicos presentes nas estruturas.

Figura 38 – Resultados obtidos dos extratos metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie *C.chinense* Jacq para técnica de captura do radical hidroxil. Valor de p não indicou diferença significativa (Teste T não pareado).



Bae et al., (2012) demonstraram que as frações hexano, acetato de etila, metanol e metanol 80% de frutos inteiros de *C. annuum* são capazes de promover a inibição da degradação da 2-DR. A atividade antioxidante pode ser atribuída não somente a presença de compostos específicos, mas também a escolha do solvente utilizado na extração.

Corroborando com os resultados do presente trabalho, Sim e Sil (2008) verificaram que extratos etanólicos obtidos do pericarpo e semente da espécie *C. annum* promoveram a inibição, de forma dose-dependente, da degradação da 2-DR. Entretanto, quando as duas estruturas foram comparadas, o extrato de pericarpo demonstrou maior atividade antioxidante.

Por outro lado, no trabalho de Oboh et al (2007), os resultados encontrados foram contraditórios. Nesse sentido, os extratos aquosos de pimentas *Capsicum annum* (variedade Tepin) e *Capsicum chinense* (variedade Habanero) não foram capazes de inibir a degradação da deoxiribose.

Tabela 6 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método Captura do radical hidroxil e os teores de compostos fenólicos, flavonoides totais dos extratos de pericarpo, semente e pedúnculo de *C. chinense* Jacq.

	Fenólicos Totais	Flavonoides Totais
Captura radical hidroxil	0,6056	0,8666*

* $p < 0,05$ (correlação significativa)

5.7.5 Avaliação da peroxidação lipídica pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

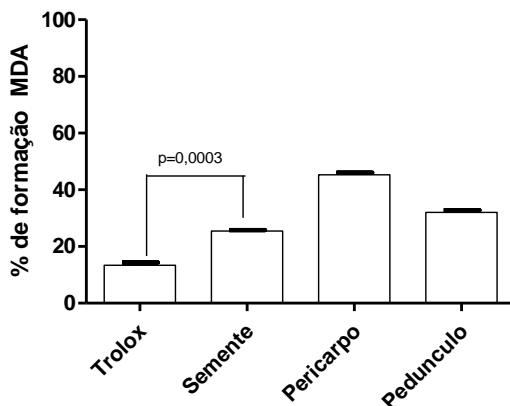
A peroxidação lipídica é decorrente do estresse oxidativo celular em determinadas patologias, devido à susceptibilidade de membranas lipídicas sofrerem ataque de radicais livres. Dentre alguns exemplos de radicais, os EROs quando produzidos em excesso, podem favorecer tal dano oxidativo nas membranas (HODGES, 2004). Nesse contexto, produtos da peroxidação como o MDA pode ser considerado um indicador de dano oxidativo. Tal composto pode reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) favorecendo a formação de produtos cromógenos, os quais podem ser quantificados em determinado comprimento de onda (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; HODGES et al., 1999).

Os resultados foram obtidos a partir dos extratos das diferentes estruturas na concentração de 10 mg.ml^{-1} . Os valores finais para o TBARS foram expressos em percentual de formação do MDA (% MDA) (Figura 38).

O método *in vitro* empregado neste estudo possibilitou inferir que todos os extratos testados (pericarpo, semente e pedúnculo) possuem a capacidade proteger as células lipídicas, contra a

lipoperoxidação. A estrutura que apresentou a melhor proteção frente à peroxidação lipídica foi a semente quando comparado ao trolox (gráfico, Figura 39). Os resultados deste estudo corroboram com Oboh et al., (2007), o qual demonstrou efeito protetor na peroxidação lipídica dos frutos maduros das variedades Tepin (*C. annum*) e Habanero (*C. chinense*). Outro estudo realizado por Kappel et al., (2007) avaliou as estruturas placenta (imatura) e semente (madura) de *C. baccatum* var. *pendulum* frente a lipoperoxidação. Os extratos foram selecionados com base no maior potencial antioxidante (TRAP), e ambos os extratos das estruturas demonstraram efeito inibitório da peroxidação lipídica.

Figura 39 – Resultados obtidos dos extratos metanólicos do pericarpo, semente e pedúnculo da espécie *C. chinense* Jacq para técnica do TBARS. Valor de p indica diferença significativa (Teste T não pareado)



Com intuito de analisar uma possível relação entre os teores das principais classes de compostos citados no presente estudo e o TBARS, foi calculado o índice de correlação de Pearson. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e sugerem que os compostos fenólicos, bem como os capsaicinoides estão relacionados com a proteção da peroxidação lipídica. Com isso, é possível postular que os capsaicinoides podem ser considerados mais eficazes na proteção frente a danos lipoperoxidativos quando comparado aos compostos fenólicos.

Em contrapartida, Bortolin (2014) demonstrou uma correlação negativa entre compostos fenólicos e o TBARS, em extrato de folha de *C. baccatum* ($r = -0,8196$; $p < 0,0001$). Entretanto, outros trabalhos descritos na literatura revelam que os polifenóis estão relacionados com

a proteção frente à lipoperoxidação (CHEN et al., 2014; GUO et al., 1996).

Tabela 7 – Coeficientes de Correlação de Pearson entre o método TBARS e fenólicos, flavonoides e capsaicinoides totais dos extratos das três estruturas de *C. chinense* Jacq.

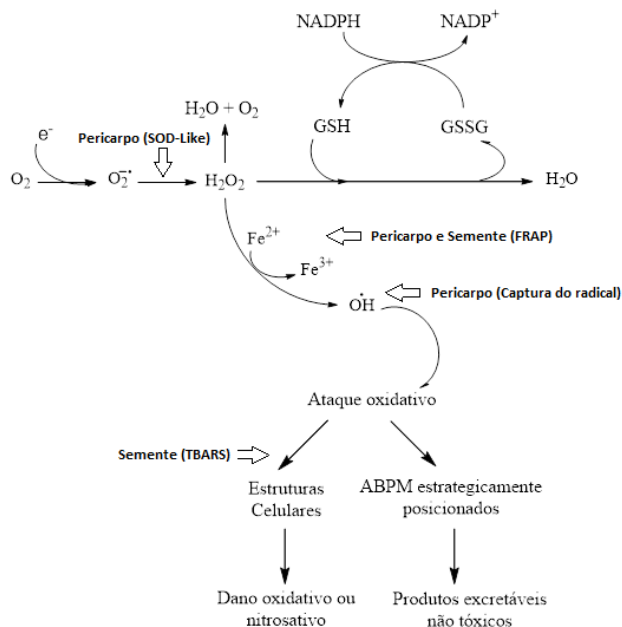
	Fenólicos Totais	Capsaicinoides totais
TBARS ^a	0,3690	0,8867*

^a – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

* $p < 0,05$ (correlação significativa)

Diante dos resultados encontrados na determinação do perfil antioxidante *in vitro*, está exposto na figura 40 abaixo, um resumo dos resultados.

Figura 40 – Resumo dos resultados encontrados na determinação do perfil antioxidante *in vitro*



Fonte: Adaptado de Gandra et al., (2004)

No geral, a estrutura que apresentou o resultado mais promissor frente à captura de radicais peroxilas foi a semente, na técnica do TRAP. No ensaio de avaliação da atividade da SOD, a estrutura do pericarpo demonstrou resultado superior quando comparado as demais estruturas. Na técnica do FRAP, as estruturas que apresentaram a melhor capacidade de redução do íon férrico foram o pericarpo e semente. O extrato do pericarpo apresentou a melhor capacidade de prevenção da degradação da 2-DR, no ensaio da captura do radical hidroxil. Ademais, na técnica do TBARS, a estrutura que melhor demonstrou proteção frente à peroxidação lipídica foi a semente.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

No presente trabalho, foram avaliados os extratos metanólicos obtidos por refluxo de diferentes partes do fruto (pericarpo, semente e pedúnculo) de *C. chinense* Jacq. frente a uma possível ação antibacteriana e antifúngica. Os resultados indicaram que não foi verificado halo de inibição no método de difusão em disco tanto para as cepas bacterianas (Tabela 8) quanto para as cepas de fungos (Tabela 9) utilizadas no ensaio.

Tabela 8 - Resultados da Atividade antibacteriana de extrato de metanólico de sementes, pericarpo e pedúnculo de *C. Chinense* Jacq.

Bactérias gram +						
Amostras	<i>C. sporogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i>
	ATCC 11437	ATCC 29212	ATCC 25923	ATCC 12228	ATCC 49619	ATCC 19615
Extratos metanólicos de <i>C. Chinense</i> Jacq.	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

Bactérias gram -						
Amostras	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. flexneri</i>
	ATCC 25922	ATCC 13047	ATCC 13883	ATCC 27853	ATCC 14028	ATCC 12022
Extratos metanólicos de <i>C. Chinense</i> Jacq.	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

* Os resultados foram expressos pelas siglas S/A (sem atividade)

Tabela 9 - Resultados da Atividade antifúngica de extrato de metanólico de sementes, pericarpo e pedúnculo de *C. Chinense* Jacq.

Fungos		
Amostras	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
	ATCC 10231	ATCC 13803
Extratos metanólicos de <i>C. chinense</i> Jacq.	S/A	S/A

* Os resultados foram expressos pelas siglas S/A (sem atividade)

Os resultados encontrados corroboram aqueles verificados por Kappel (2007). No referido estudo, somente os extratos hidroalcoólicos de sementes de frutos imaturos de *C. baccatum* var. *pendulum* demonstraram eficácia frente a cepas *Candida* spp. e *Cryptococcus neoforms*. Entretanto, para os extratos de diferentes partes do fruto maduro da espécie estudada, os resultados foram ineficazes.

Outros trabalhos que avaliaram a atividade antibacteriana de espécies do gênero *Capsicum* também não obtiveram resultados promissores. De acordo com o estudo de Santos (2010), os extratos de *C. annuum* não inibiram o crescimento de cepas das bactérias *E. faecalis* e *E. coli*. Efeito semelhante foi demonstrado por Carvalho (2010) na avaliação da atividade antibacteriana de frutos maduros de *C. annuum* L. e *C. baccatum* L. ("pimenta cambuci"). Por outro lado, no mesmo trabalho, três variedades de pimentas do gênero *Capsicum* com elevado grau de pungência ("pimenta dedo de moça", "pimenta de jardim" e "pimenta malagueta") apresentaram fraca atividade antibacteriana frente as cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*.

Cruz et al. (2003) postulam que a atividade antibacteriana das pimentas estaria relacionada com o seu grau de pungência e que esse está intimamente ligado a concentração de capsaicinoides. Por outro lado, já foi verificada atividade antibacteriana em pimentas com baixo grau de pungência (CICHEWICZ; THORPE, 1996). No presente estudo, apesar dos extratos metanólicos de diferentes partes do fruto de *Capsicum chinense* Jacq. apresentarem elevado teor de capsaicinoides, não foi verificada atividade antibacteriana e atividade antifúngica dos extratos investigados.

CONCLUSÕES

- Os extratos metanólicos das estruturas pericarpo, semente e pedúnculo, obtidos pelo método extrativo refluxo apresentaram maior rendimento em comparação aos extratos obtidos por ultrassom.

- A quantificação de compostos fenólicos indicou que a estrutura do pedúnculo apresentou os maiores teores de TFT quando comparado a semente e pericarpo tanto nos ensaios por Folin Ciocalteu como por Fast Blue BB. Com exceção do extratos obtidos por ultrassom da estrutura semente, o processo de extração por refluxo apresentou os maiores teores nos extratos avaliados.

- O método de extração por refluxo permitiu a obtenção de maiores teores de FT quando comparado ao método por ultrassom em todos os extratos avaliados.

- Nas análises por CLAE, os maiores teores de capsaicina e dihidrocapsaicina foram detectados nos extratos do pericarpo, obtidos por ultrassom.

- A técnica de CL/HREM permitiu sugerir a presença das antocianinas delphinidina-3-*p*-cumaroilrutinosídeo-5-glicosídeo e peonidina-3-sambubiosídeo no extrato do pericarpo de *C. chinense*.

- Para a técnica do TRAP, a estrutura que apresentou resultado mais promissor frente à captura dos radicais foi a semente. Adicionalmente, no TAR, a estrutura que apresentou o melhor perfil de reatividade inicial foi o pedúnculo.

- Foi possível verificar uma correlação positiva forte entre os teores de compostos fenólicos e o TAR.

- No ensaio de FRAP, as estruturas que obtiveram a melhor capacidade de redução íon (Fe^{3+}) foram a semente e o pericarpo, não apresentando diferença significativa entre as mesmas. Além disso, é possível observar uma correlação negativa significativa entre os teores de fenólicos, capsaicina e o FRAP.

- Na avaliação da atividade da SOD, as estruturas pericarpo e pedúnculo demonstraram capacidade de reduzir o composto NBT à sal de formazana, sendo que a atividade do pericarpo foi superior quando comparada ao pedúnculo.

- Não foi verificada correlação positiva direta entre os teores de compostos fenólicos e flavonoides com a atividade da SOD.

- Na técnica captura do radical hidroxil, o extrato do pericarpo apresentou a melhor capacidade de prevenção da degradação da 2-DR. Os índices de correlação encontrados indicaram que tanto os compostos

fenólicos quanto os flavonoides apresentam uma correlação positiva com a atividade de prevenção da degradação da 2-DR.

- Na técnica de TBARS, a estrutura que proporcionou a melhor proteção frente à peroxidação lipídica foi a semente. Além disso, foi possível inferir que os compostos fenólicos, bem como os capsaicinoides estão relacionados com a proteção da peroxidação lipídica.

- Os extratos avaliados pelo ensaio de difusão em disco não apresentaram atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ADWAN, G. M.; ABU-SHANAB, B. A.; ADWAN, K. M. *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4239-4241, 2009.
- AGUIAR, A. et al. Mecanismos e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, p. 623-628, 2007.
- ANDO, T et al. Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 6, p. 623-650, 1999.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; la ROSA, L. A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeno and Serrano peppers. **J. Agrc. Food Chem.**,v. 59, p. 163-173, 2011.
- AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. **International journal of food science & technology**, v. 42, n. 8, p. 985-991, 2007.
- ANDERSEN, O. M.; FOSSEN. Characterization of anthocyanins by NMR. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2003.
- ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The Anthocyanins. In: ANDERSEN, O. M. e MARKHAM, K. R. (Ed.). **FLAVONOIDS - Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York - USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. cap. 10, p.1199.
- ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and applications**. New York - USA: 2006. ISBN 0-8493-2021-6.

ANDREWS, J. **Peppers: the domesticated Capsicums**. 1984. 170p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V. 2004. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf
Acesso em: 15 nov 2015.

ARORA, R.; GILL, N. S.; CHAUHAN, G.; RANA, A. C. An Overview about Versatile Molecule Capsaicin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, p. 280-286, 2011.

ASEN, S.; STUART, N. W.; SIEGELMAN, H. W. Effect of various concentrations of nitrogen, phosphorus and potassium on sepal color of *Hydrangea macrophylla*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 73, p. 495-502, 1959.

AZA-GONZÁLEZ, C; NÚÑEZ-PALENIUS, H. G; OCHOA-ALEJO, N. Molecular biology of chili pepper anthocyanin biosynthesis. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 1, p. 93-98, 2012.

AZA-GONZÁLEZ, C; OCHOA-ALEJO, N. Characterization of Anthocyanins from Fruits of Two Mexican Chili Peppers (*Capsicum annum* L.). **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 149-151, 2012.

BAE, H. et al. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 751-758, 2012.

BAI, X. L; YUE, T. L; YUAN, Y-H; ZHANG, H-W. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3751-3758, 2010.

BALDI et al. HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 2104-2109, 1995.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BARBOZA, G. E.; BIANCHETTI, L. D. B.; LAMMERS, T. G. Three New Species of Capsicum (Solanaceae) and a Key to the Wild Species from Brazil. **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 863-871, 2005.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BESPALHOK F., J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação de germoplasma. **Melhoramento de plantas**, Setor de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br>. Acesso em: 08/08/2015.

BETONI, E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

BEYER, W. F.; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 559-566, 1987.

BIOSYSTEMS., Applied (Org.). **Espectrometria de Massas e suas Aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005.

BORTOLIN, R. C. **Avaliação dos efeitos do ozônio sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos de folhas e frutos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica). Porto Alegre 2013.

BORTOLIN, R. C., CAREGNATO, F. F., DIVAN, A. M., REGINATTO, F. H., GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F. Effects of chronic elevated ozone concentration on the redox state and fruit yield of red pepper plant *Capsicum baccatum*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 100, p. 114-121, 2014.

BORRÁS-LINARES, I. et al. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.

BOSLAND, P. W. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. **Progress in new crops**, p. 479-487, 1996.

BOSLAND; VOTAVA, E. J. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. **Crop Production Science in Horticulture Series**, v. 12, 2000.

BOSLAND; VOTAVA. **Peppers : vegetable and spice capsicums**. 2. 2012.

BOULTON, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 2, p. 67-87, January 1, 2001.

BRITISH PHARMACOPOEIA. British Pharmacopoeia Commission. London: The Stationery Office; 2011. p. 3592-3

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1311-1323, 1983.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J.-E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 5, p. 1359-1364, 1977.

BUENO, J. M. et al. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126-151, 2012.

CANUTO, G. A. B. et al. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. **Food Chemistry**, v. 192, p. 566-574, 2016.

CAREAGA, M. et al. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 331-335, 2003.

CARRIZO, G. C. et al. Wild Capsicums: identification and in situ analysis of Brazilian species. **XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant**, p. 205-213, 2013.

CARVALHO, S.; BIANCHETTI, L.; HENZ, G. Germplasm collection of Capsicum spp. maintained by Embrapa Hortaliças (CNPH). **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 22, p. 17-20, 2003.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. p. 519.

CARVALHO, S. I.; BIANCHETTI, L. B. Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp): Botânica., 2007. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_pimenta/botanica.htm>. Acesso em: 05 jul 2015.

CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M.; CRUZ, F. T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, P. 9-12, 2010.

CASALI; COUTO. **Origem e botânica de Capsicum**. Belo Horizonte. , p.113p. 1984

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CICHEWICZ, R. H.; THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 61-70, 1996.

CISNEROS-PINEDA, O. TORRES-TAPIA, L.W.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L.C.; CONTRERAS-MARTÍN, F.; GONZALEZ-ESTRADA, T.; PERAZA-SANCHEZ, S.R. Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1755–1760, 2007.

CIZ, M. et al. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 518-523, 2010.

COLE, R. B. **Electrospray ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation & Applications**. 1. ed. New York: Wiley, 1997.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1096-1104, 2007.

CONSTANT, H. L.; CORDELL, G. A.; WEST, D. P. Nonivamide, a Constituent of *Capsicum* oleoresin. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 425-426, 1996.

CORNARD, J. P.; MERLIN, J. C. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. **Journal of Molecular Structure**, v. 569, p. 129-138, 2001.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CHAIM, A. B.; BOROVSKY, Y.; DE JONG, W.; PARAN, I. Linkage of the A-Locus for the presence of anthocyanin and fs10.1, A major fruit shape QTL in pepper. **Theor. Appl. Genet.**; v. 106, p. 889-894, 2003.

CHEEMA, S. K.; PANT, M. R. Estimation of capsaicin in seven cultivated varieties of *Capsicum Annuum* L. Res. **Journal Pharmacology. Biologu Chemistry. Sci.**, v. 2, p. 701-706, 2011.

CHEN. L.; KANG, Y. Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1724-1731, 2013.

CHEN, L., HWANG, J. E., GU, K. M., KIM, J. H., CHOI, B., SONG, K. S.; KANG, Y. H. Comparative study of antioxidant effects of five Korean varieties red pepper (*Capsicum annuum* L) extracts from various parts including placenta, stalk, and pericarp. **Food Science and Biotechnology**, v. 21(3), p. 715-721, 2012.

CHEN, W. et al. Effect of Tea Polyphenols on Lipid Peroxidation and Antioxidant Activity of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Fruit during Cold Storage. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16837-16850, 2014.

CRUZ, F. T.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação da atividade antibacteriana em pimentas (*Capsicum* sp) e sua relação com o teor de capsaicinoides. In: Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 15. **Resumos**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, v. 1, p. 503.

DA COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography– mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 403-410, 2000.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

DANGLES, O.; WIGAND, M. C.; BROUILLARD, R. The International Journal of Plant Biochemistry Anthocyanin anti-copigment effect. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3811-3812, 1992.

DAO, L. T. et al. Improved Method for the Stabilization of Anthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3564-3569, 1998.

DEAL, C. J.; SCHNITZER, T. J.; LIPSTEIN, E.; SEIBOLD, J. R.; STEVENS, R. M.; LEVY, M. D.; ALBERT, D.; RENOLD, F. Treatment of arthritis with topical capsaicin: A double-blind trial. **Clin. Ther.**, v. 13, p. 383-395, 1999.

DEEPA, N. et al. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 121-129, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DEMIRDÖVEN, A.; ÖZDOĞAN, K.; ERDOĞAN-TOKATLI, K. Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage by Ultrasonic and Conventional Methods: Optimization and Evaluation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 491-500, 2015.

DENG, H.; VAN BERKEL, G.J. Electrospray mass spectrometry and UV/Visible spectrophotometry studies of aluminium (III) - flavonoid complexes. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 1080-1087, 1998.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: From plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 281 -299, 2008.

DE PASCUAL-TERESA, Sonia; MORENO, Diego A.; GARCÍA-VIGUERA, Cristina. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 4, p. 1679-1703, 2010.

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru) . In **Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.

DIAZL, J.; POMAR, F.; BERNALL, A.; MERINO, F. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 141-157, 2004.

DI MEO, F. et al. Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, n. 10, p. 2082-2092, 2013.

DOMENICO, C. I.; LILLI, A. J. O.; MELO, A. M. T. **Caracterização de componentes de produção de híbridos intra-específicos de pimenta-hortícola.** CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 50. Resumos. Guarapari: ABH (CD-ROM). 2010.

DORANTES, L.; COLMENERO, R.; HERNANDEZ, H.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; FERNANDEZ, E.; SOLANO, C. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, p. 125-128, 2000.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DYRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food chemistry**, v. 72, n. 4, p. 431-437, 2001.

EMBRAPA. In: *Capsicum: Pimentas e Pimentões do Brasil.*, 2015. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.htm#chinense>>. Acesso em: 03 jul 2015.

ESHBAUGH, W. H. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. **Center for New crops & Plants Products**, p. 132-139, 1993.

ESTRADA, B.; BERNAL, M. A.; DIAZ, J.; POMAR, F.; MERINO, F. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annuum* L. in relation to fruiting. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1188-1191, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0. 5. ed. Supplement Strasbourg: Council of Europe; 2005.

EVERETT, M. E. Effect of carbohydrates and other factors on strawberry product. **Journal of Agriculture. Food Chemistry**, v. 1, p. 574, 1953.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **Statistical Database**, 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 07 set 2015.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. p. 558. v. 2. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em: 15 nov 2012.

FAN, G et al. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 155-160, 2008.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 251-260, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FLESCHHUT, J. et al. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. **European Journal of Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 7-18, 2006.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: Taylor e Francis Group, 2006. p. 37.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomed. Pharmacother.** v. 57, p. 251-260, 2003.

FUJIWAKE, H.; SUZUKI, T.; IWAI, K. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of *Capsicum* fruits. **Agric. Biol. Chem.**, v. 46, p. 2591-2595, 1982.

FURTADO, A. A. L.; DUTRA, A. S.; DELIZA, R. **Processamento de “Pimenta Dedo-de-Moça” (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) em Conserva**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Rio de Janeiro 2006.

GALLO, M.; NAVIGLIO, D.; FERRARA, L. Nasunin, an antioxidant anthocyanin from eggplant peels, as natural dye to avoid food allergies and intolerances. **European Scientific Journal**, v. 10, n. 9, 2014.

GAMARRA, F. M. C.; LEME, G. C.; TAMBOURGI, E. B.; BITTENCOURT, E. Extração de corantes de milho (*Zea Mays L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 62-69, 2009.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 6, p. 980-985, 2004

GENUNCIO, G. C.; ZONTA, E.; NASCIMENTO, E. C. Pimenta – Tipos e ardências que fazem toda a diferença. 2015. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/pimenta-tipos-e-ardencias-que-fazem-toda-a-diferenca/>>. Acesso em: 12 set 2015.

GIUSTI, M. et al. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4657-4664, 1999.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14,p. 217–225, 2003.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794–802, 2013.

GOULD, K. S.; LISTER, C. Flavonoid Functions in Plants. In: ANDERSEN., Ø. M. e MARKHAM., K. R. (Ed.). **FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York - USA: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2006. cap. 8, p.1199.

GOUVEIA-FIGUEIRA, S. C.; CASTILHO, P. C. Phenolic screening by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and antioxidant capacity of leaves, flowers and

berries of *Rubus grandifolius* Lowe. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 28-40, 2015.

GOVINDARAJAN, V. S.; RAJALAKSHMI, D.; CHAND, N. *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. **Crit. Rev. Food Sci Nutr.**, v. 25, p. 185-282, 1987.

GUO, Q. et al. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1304, n. 3, p. 210-222, 1996.

GROSS, J. H. *Mass Spectrometry- A Textbook*. Berlin: Springer, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs and Aging**, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 Ed. ed. Oxford: Oxford: Clarendon Press, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Sciences: Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, USA, New York, NY.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fifth ed. Oxford University Press, USA, New York, NY.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HAYMAN, M.; KAM, C.A. P. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 19, p. 338-343, 2008.

HENDERSON, D. E.; SLICKMAN, A. M.; HENDERSON, S. K. Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 2563-2570, 1999.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HEISER, C. B. Peppers *Capsicum* (Solanaceae). **The evolution of crops plants**, p. 265-268, 1976.

HERTOG, M. G. G.; SWEETNAM, P. M.; FEHILY, A. M.; ELWOOD, P. C.; KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and ischaemic heart disease in a Welsh population of men. The Caerphilly study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 65, p. 1489-1494, 1997.

HERVERT-HERNANDEZ, D.; SAYAGO-AYERDI, S.G.; GONI, I. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.): antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3399-3406, 2010.

HIDALGO, M. et al. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. **Genes & nutrition**, v. 7, n. 2, p. 295-306, 2012.

HIJAZI, A. et al. "Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese *Urtica Dioica*." **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 1, p.507-513, 2013.

HODGES, D. M. et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues

containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HODGES, D. Mark et al. Oxidative stress: importance for postharvest quality. **HortScience**, v. 39, n. 5, p. 924-929, 2004.

HOUBIERS, C. et al. Color Stabilization of Malvidin 3-Glucoside: Self-Aggregation of the Flavylum Cation and Copigmentation with the Z-Chalcone Form. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3578-3585, 1998.

HOUGHTON, P; RAMAN, A. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. Springer Science & Business Media, 1998.

HOWARD, L.R.; TALCOTT, S.T.; BRENES, C.H.; VILLALON, B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1713-1720, 2000.

HUANG, X.F.; XUEA, B.; JIANG, A.Q.; ZHU, H.L. Capsaicin and Its Analogues: StructureActivity Relationship Study. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2661-267, 2013.

ICHIYANAGI et al. Nasunin from eggplant consists of cis-trans isomers of delphinidin 3-[4-(p-coumaroyl)-L-rhamnosyl (1→ 6) glucopyranoside]-5-glucopyranoside. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9472-9477, 2005.

IWAI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWAKE, H.; OHA, S. Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography mass spectrometry. **J. Chromatography**, v. 172, p. 303-311, 1979.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KAALE, E.; SCHEPDAEL, A. V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1331-1337, 2002.

KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4076–4082, 2001.

KAPPEL, V. D. et al. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 2, p. 267-274, 2007.

KATSABOXAKIS, K.; PAPANICOLAOU, D.; MELANITOU, M. Stability of pigmented orange anthocyanins in model and real food systems. **Italian journal of food science**, v. 10, n. 1, p. 17-25, 1998.

KIM, D-O.; LEE, C. Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 4, p. 253-273, 2004.

KIRSCHBAUM-TITZE, P.; HIEPLER, C.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*).1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p.1260–1263, 2002.

KHODDAMI, A; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KONCZAK, I; ZHANG, W. Anthocyanins—more than nature's colours. *BioMed Research International*, v. 2004, n. 5, p. 239-240, 2004.

KONDO, T. et al. Structure of cyanodelphin, a tetra-p-hydroxybenzoated anthocyanin from blue flower of *delphinium hybridum*. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 44, p. 6375-6378, 1991.

KONG, J-Mi et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOZUKUE, Nobuyuki et al. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass

spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9172-9181, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1283-1287, 2006.

KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; LUKASZEWICZ, M.. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. **Current topics in Biophysics**, v. 24, n. 2, p. 89-96, 2000.

KRELL, E. **Handbook of laboratory distillation**. New York: Elsevier, v. 2, 1982.

LANNES, S. D. **Diversidade em Capsicum chinense: análise química, morfológica e molecular**. Viçosa, p.1-73. 2005

LANNES, S. D. et al. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 3, p. 266-270, 2007.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol Luminescence Induced by 2,2'-Azo-Bis(2-Amidinopropane) Thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, n. 5, p. 299-311, 1992.

LISSI, E., SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CATILHO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biologic Medicinal**, v 18, p. 153-158, 1995.

LEE, J; DURST, R.W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 782-786, 2008.

LIGHTBOURN, G. J. et al. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. **Journal of heredity**, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2008.

LOBO, V. et al. "Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health." **Pharmacognosy Reviews**, v. 4.8, p. 118–126, 2010.

LOIZZO, M. R. et al. Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annuum* L. cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 392-401, 2013.

LOIZZO, M. R. et al. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 623-631, 2015.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 1–2, p. 142-152, 1999.

MACHO, A et al. Nonpungent capsaicinoids from sweet pepper synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. **Eur. J. Nutr.**, v. 42, p. 2-9, 2003.

MAHDAVIAN, K.; GHORBANLI, M.; KALANTARI, Kh M. The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L. **Turkish Journal of Botany**, v. 32, n. 1, p. 25-33, 2008.

MARÍN, A. et al. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3861-3869, 2004.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-180.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, p.113, 1982.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, O. M. e MARKHAM, K. R. (Ed.). **FLAVONOIDS - Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York - USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. cap. 1, p.1199.

MASAWAKI, T; TAYA, M; TONE. Selective solvent extraction of ruberythric acid from madder roots and subsequent hydrolysis with β -glucosidase. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 567-569, 1996.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1750-1756, 2005.

MATERSKA, M. et al. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. **Phytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 893-898, 2003.

MARTESKA, M.; KONOPACKA, M.; ROGOLIN, J.; S'LOSAREK, K. Antioxidant activity and protective effects against oxidative damage of human cells induced by X-radiation of phenolic glycosides isolated from pepper fruits *Capsicum annuum* L. **Food Chemistry**, v. 188, p. 546-553, 2015.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 2, p. 79-87, 2011a.

MEDINA, M. B. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1565-1571, 2011b.

MEGHVANSI, M. K. et al. Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 1-14, 2010.

MELO, E. A. et al. Capacidade Antioxidante de Hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, 2006.

MELO, C.M.T. et al. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pimentas *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade *praetermissum* (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta)**. Enciclopédia biosfera, Centro científico Conhecer - Goiânia, v. 7, n.12, o 1-2, 2011.

MENICHINI, F et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 553-560, 2009.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

MESCHTER, E.E. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. **Journal Agricultural. Food Chemistry**, v. 1, p. 574-579, 1953

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MISSANG, E. C.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. Flavonols and anthocyanins of bush butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) HJ Lam, fruit. Changes in their composition during ripening. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7475-7480, 2003.

MORESCO, K. S. **Potencial antioxidante, efeito do processo de secagem e extração de compostos bioativos de pimentas capsicum**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Porto Alegre, 2013.

MOORE, A. B.; FRANCIS, F. J.; JASON, M. E. Acylated anthocyanins in red onions. **Journal of Food Protection®**, v. 45, n. 7, p. 590-593, 1982.

MOORE, D. J.; MOORE, D. M. Synergistic *Capsicum*-tea mixtures with anticancer activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 55, p. 987-994, 2003.

MOSES, M.; UMAHARAN, P. Genetic Structure and Phylogenetic Relationships of *Capsicum chinense*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 137, n. 4, p. 250-262, 2012.

MCGEE, H. **On food and cooking: the science and lore of the kitchen**. New York: Scribner, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95-111, 2004.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO, P.L.A.; NASCIMENTO, T.C.E.S.; RAMOS, N.S.M et al. Quantification, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from Different Extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). **Molecules**, v.19, p. 5434-5447, 2014.

NEITZKE, R. S. et al. **Caracterização morfológica e estimativa da distância genética de acessos de pimenta do banco ativo de germoplasma de Capsicum da Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.40p. 2014

NETTO, D. A. M. Coleção de base e coleção tiva : O banco de germoplasma de sorgo. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 7-26, 2010.

NWOKEN, C. O.; AGBAJI, E. B.; KAGBU, J. A.; EKANEM, E. J. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. **New York Science Journal**, v. 3, p. 17-21, 2010.

OBOH, G.; PUNTEL, R. L.; ROCHA, J. B. T. Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum Chinese*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain–in vitro. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2007.

OCHI, T.; TAKAISHI, Y.; KOGURE, K.; YAMAUTI, I. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. **Journal Nature Products**. v. 66, p. 1094-1096, 2003.

OTHMAN, Z. A. A.; AHMED, Y. B. H.; HABILA, M. A.; GHAFAR, A. A. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. **Molecules**, v. 16, p. 8919-8929, 2011.

OU, B. et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PETERSON, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v.100, p.201–220, 1979.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods in Enzymology**, v.91, p.95–119, 1983.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129-133, 1997.

PINO, J., GONZALEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURION-YAH, A.R.; TRUJILLOAGUIRRE, J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. **Food Chemistry**, v. 104, p.1682–1686, 2007.

PINO, J.; FUENTES, V.; BARRIOS, O. Volatile constituents of Cachucha peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) grown in Cuba. **Food chemistry**, v. 125, n. 3, p. 860-864, 2011.

PITTET, D. Infection control and quality health care in the new millennium. **Am. J. Infect Control**, v. 33, p. 258-267, 2005.

POWIS, T. G. et al. Prehispanic Use of Chili Peppers in Chiapas, Mexico. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2013.

POZZI, S. C. A. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do "Maracujá"**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Analítica), São Carlos, 2007.

POZZOBON, T. M. et al. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 13, n. 2, p. 96-100, 2015.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

PHARMACOPÉE FRANÇAISE 2007. 10th. ed. Paris: Ministère de la Santé; 2007.

PROVENZANO, S. et al. Genetic Control and Evolution of Anthocyanin Methylation. **Plant physiology**, v. 165, n. 3, p. 962-977, 2014.

RAHIM, R. A.; MAT, I.; Phytochemical Contents of *Capsicum Frutescens* (Chili Padi), *Capsicum Annum* (Chili Pepper) and *Capsicum Annum* (Bell Peper) Aqueous Extracts. In: **International conference on Biological and life sciences**, p. 164-167, 2012.

REIFSCHNEIDER. **Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil**. Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa hortaliças, p. 113, 2000.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

REIN, M. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**: University of Helsinki Helsinki 2005.

REVERCHON, E.; ÓSSEO, L. S. Supercritical CO₂ extraction of basil oil: Characterization of products and process modeling. **The Journal of supercritical fluids**, v. 7, p. 185-190, 1994.

REVILLA, E.; RYAN, J.-M.; MARTÍN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4592-4597, 1998.

REYES-ESCOGIDO, M. de L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E. G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. **Molecules**, v.16, p. 1253-1270, 2011.

RIBEIRO et al. Pimentas Capsicum. **Embrapa Hortaliças. Sistemas de produção**, 2008. Disponível em:
<http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00082720.pdf>.
Acesso em: 07 set 2015.

RIBEIRO, C. S. C. et al. Pimenta (Capsicum spp.) - Cultivares. **Embrapa Hortaliças**, 2007. Disponível em:
<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_pimenta/cultivares.htm>. Acesso em: 08 set 2015.

RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P. Pimenta (Capsicum spp.). Processamento - Consumo. **Embrapa Hortaliças. Sistemas de produção**, 2007. Disponível em:
<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_pimenta/precassamento.htm>. Acesso em: 07 jul 2015.

RIBEIRO, C. S. C. et al. Pimenta (Capsicum spp.) - Comercialização Versão Eletrônica, 2007. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/comercializacao.html>. Acesso em: 02 ago 2015.

RIBEIRO, C. S. C. et al. Pimenta (Capsicum spp.) – Comercialização. **Embrapa Hortaliças, Sistema de Produção 2**, 2007. Versão Eletrônica. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/comercializacao.html>. Acesso em: 02 jul 2015.

RIBEIRO, C. S. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Genética e melhoramento**. Pimentas Capsicum. Brasília: Embrapa Hortaliças. EMBRAPA: 55-69 p. 2008.

RIBEIRO, C. S. C. et al. Programa de melhoramento genético de Capsicum da Embrapa Hortaliças para processamento industrial. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2003. Porto Seguro. Trabalhos técnicos.

RIVAS, M. et al. Nutraceutical properties and toxicity studies of flour obtained from Capsicum pubescens fruits and its comparison with "Locoto" commercial powder. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 715-724, 2014.

REMY-TANNEAU, S. et al. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3592-3597, 2003.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**, v. 112, p. 11R-34R, 1997.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

ROY, S. A.; PAL, T. K.; BHATTACHARYYA, S. Effect of thermal processing on in vitro antioxidant potential of Capsicum (*Capsicum annuum*) of different ripening stages. **Journal of Pharmacy Research**, v. 8, n. 12, p. 1751-1756, 2014.

SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 7-8, p. 527-535, 2006.

SAITO, N.; CHENG, J.; ICHIMURA, M.; YOKOI, M.; ABE, Y.; HONDA, T. Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 687-691, 1994.

SAITO, N. et al. The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 36, p. 6821-6823, 2003.

SANTOS, M. M. P. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Shinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, e de análogos sintéticos da capsaicina, frente aos microorganismos da cavidade oral.** Dissertação (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes, p. 47, 2010.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. S31-S38, 1991.

SILVA, W. C. J. **Escolha dos descritos mínimos e estabelecimento de coleções nucleares em *Capsicum* spp.** Goiânia, p. 1-125, 2008

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzy**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIM, K. H.; SIL, H. Y. Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum*) pericarp and seed extracts. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 10, p. 1813-1823, 2008.

SOUZA, M. A. L. **Caracterização citogenética, química e molecular de *Capsicum chinense* Jacq.** Dissertação (Mestrado em Genética Vegetal). Campo dos Goytacazes, p. 67, 2008.

SUPALKOVA, V.; STAVELIKOVA, H.; KRIZKOVA, S.; ADAM, V.; HORNA, A.; HAVEL, L.; RYANT, P.; BABULA, P.; KIZEK, R. Study of capsaicin content in various parts of pepper fruit by liquid chromatography with electrochemical detection. **Acta. Chim. Slov.**, v. 54, p. 55059, 2007.

SURH, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1091–1097, 2002.

SUZUKI, T.; IWAI, K. Constituents of red pepper species: Chemistry, biochemistry, pharmacology, and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. **The alkaloids**, v. 23, p. 227-299, 1984.

SCALBERT, A; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287–306, 2005.

SPILLER, F. et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan and antigen-induced inflammation. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 473-478, 2008.

SHALABY, E.; SHANAB, S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528-539, 2013.

SHARMA, R.; CHINN, M; BOYETTE, M. Solvent Extraction and Composition Analysis of Capsaicin from Different Parts of Habanero Peppers (*Capsicum Chinese*) For Application in Food Processing. **Bioprocess Engineering Laboratory in Weaver Labs at the NCSU, Raleigh campus**, 2015. Disponível em: https://www.cals.ncsu.edu/specialty_crops/publications/reports/2004/rat_nasharms_Capsaicin.htm. Acesso em: 10 nov 2015.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, 21-40, 2001.

SCHOETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 861-880, 2002.

SHOTORBANI, N. Y.; JAMEI, R.; HEIDARI, R. Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 25, 2013.

SMITH, P. G.; HEISER, C. B., JR. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the Geographic Distribution of the Cultivated *Capsicum* Species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 84, n. 6, p. 413-420, 1957.

STINTZING, F. C. et al. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6172-6181, 2002.

SMITH, P. G.; HEISER, C. B., JR. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the Geographic Distribution of the Cultivated *Capsicum* Species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 84, n. 6, p. 413-420, 1957.

TATSUZAWA, F. et al. Acylated delphinidin 3-rutinoside-5-glucosides in the flowers of *Petunia reitzii*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 913-917, 2000.

TEUSCHER, E. Pharmazeutis chebiologie. 4 Aufl., **Braunschweig: Friedrich Vieweg**, 1990.

THIELE, R.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 4219-4224, 2008.

TONON de SOUZA, P.; ROSSI, A. V. Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinoides em pimentas *Capsicum* a partir da reação com o complexo de Co(II) com 4-(2-PIRIDILAZO) RESORCINOL. **Química Nova**, v. 37, p. 631-637, 2014.

TRADE INFORMATION BRIEF, T. *Capsicum*. South African Development Community **Trade Development: Pretoria**, p. 5, 2005.

VAN WYK, B. E.; WINK, M. **Medicinal plants of the world : an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses**. Portland: Timber Press, 2004.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Biosynthesis of Flavonoids and Condensed Tannins In: SPRINGER (Ed.). **Phenolic Compound Biochemistry**. Netherlands, 2006. p.267.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Netherlands Springer, p.267, 2006.

VIKTORIJA, M et al. Antioxidative effect of Capsicum oleoresins compared with pure capsaicin. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 11, p. 44-48, 2014.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 577-614.

ZHAO, J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: A perspective on plant biotechnology application. **Recent Patents on Biotechnology**, v.1, p.75–97, 2007.

ZHANG, L. L.; LIU, D. Y.; MA, L. Q.; LUO, Z. D.; CAO, T. B.; ZHONG, J.; YAN, Z. C.; WANG, L. J.; ZHAO, Z. G.; ZHU, S. J.; SCHRADER, M.; THILO, F.; ZHU, M. Z.; TEPEL, M. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. **Circ. Res.**, v. 100, p. 1062-1070, 2007.

VOTAVA, E. J.; BOSLAND, P. W. NuMex Suave Red'and 'NuMex Suave Orange'mild *Capsicum chinense* cultivars. **HortScience**, v. 39, n. 3, p. 627-628, 2004.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 670-675, 2008.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of Capsicum (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy Introns. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 162, p. 1409-1418, 2001.

- WANG, J.; KALT, W.; SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3330-3335, 2000.
- WANG, S. Y.; ZHENG, W.; GALLETTA, G. J. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6534-6542, 2002.
- WANG, H.; RACE, E. J.; SHRIKHANDE, A. J. Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7989-7994, 2003.
- WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S.J. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Letters**, v. 187, p. 33-37, 1985.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biol. Med.** v. 36, p. 838-849, 2004.
- WILLSTATTER, R.; ZOLLINGER, E. Anthocyanins. XVI. Anthocyanins of the grape and of the bilberry. II. **J Chem Soc**, Abstracts, p.47-48, 1916.
- WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3101-3113, 2005.
- WU, X.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1865-1871, 2002.
- WHITEHOUSE C. M. et al. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, p.675-679, 1985.

WROLSTAD, R. E. et al. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. **Journal of food science**, v. 55, n. 4, p. 1064-1065, 1990.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 423-428, 2005.