

Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos  
fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var.  
*pendulum*

**MARIA LUCY VIEIRA DE ASSIS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
Abril – 2014

Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos  
fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var.  
*pendulum*

**MARIA LUCY VIEIRA DE ASSIS**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro, como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestrado em  
Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
Abril – 2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 058/2014

Assis, Maria Lucy Vieira de

Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* / Maria Lucy Vieira de Assis. – 2014.

117 f. : il.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 107 – 117.

1. Antioxidantes naturais 2. *Capsicum baccatum* 3. CLAE I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 635.643

Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos  
fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var.  
*pendulum*

**MARIA LUCY VIEIRA DE ASSIS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestrado em Produção Vegetal.

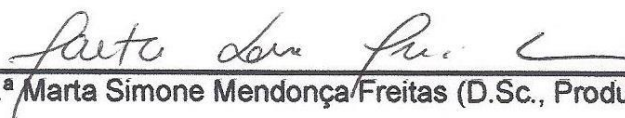
Aprovada em 03 de abril de 2014

Comissão Examinadora



---

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (D.S., Química de Produtos Naturais) – UFRRJ



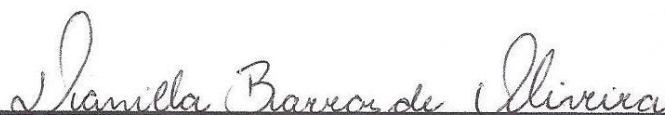
---

Prof.ª Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



---

Prof. José Tarcisio Lima Thiebaut (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



---

Prof. Drª Daniela Barros de Oliveira (D.S., Química de Produtos Naturais) – UENF  
(Orientadora)

A Deus, à minha mãe Therezinha,  
ao meu irmão Nilton Jr. e ao meu  
noivo Murilo.

“Elevo os meus olhos para os montes;  
de onde me vem o socorro?  
O meu socorro vem do Senhor,  
que fez os céus e a terra.  
Não deixará vacilar o teu pé;  
aquele que te guarda não dormitará.  
O Senhor é quem te guarda;  
o Senhor é tua sombra à tua mão direita.  
O Senhor te guardará de todo o mal;  
Ele guardará a tua vida.  
O Senhor guardará a tua saída e a tua entrada,  
desde agora e para sempre.” (Salmo 121)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço acima de tudo a Deus por ter me iluminado, me tornado capaz e principalmente por ter me fortalecido nos momentos difíceis. Sem Ele eu nada seria! Agradeço também a Nossa Senhora por ter passado na frente e aberto os longos caminhos que percorri nestes dois anos;

Agradeço a UENF, pela oportunidade de aqui desenvolver este trabalho;

A CAPES, pelo suporte financeiro;

Agradeço à Professora Daniela Barros de Oliveira, pela oportunidade e orientação, por todos os ensinamentos e pela dedicação ao desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Agradeço com imenso carinho ao Professor Tarcisio Lima Thiebaut, por todo ensinamento, toda dedicação e disponibilidade ao realizar os testes estatísticos e por ter aceitado fazer parte desta banca;

Ao Professor Douglas Siqueira Chaves por fazer parte desta banca;

À Professora Marta Simone Mendonça Freitas por aceitar fazer parte desta banca;

Aos meus pais, Nilton e Therezinha, pelos ensinamentos e por ter me tornado o que sou hoje. Ao meu irmão Nilton Júnior, por todo suporte e pela torcida. Agradeço em especial à minha mãe, pela dedicação incondicional! Pelas noites em claro comigo, me ditando dados de tabela, pela companhia nas viagens a Campos quando não dormia à noite! Por todo incentivo e toda força nas vezes que pensei que não era capaz! Mãe este trabalho, também é seu!

Às amigas de laboratório Clara, Lorena, Natalia e Larissa, pelo acolhimento, por todo ensinamento, toda companhia e todas as risadas. Sem vocês não teria chegado até aqui!

Em especial, agradeço à minha grande amiga Silvia Pereira! Você vai ficar pra sempre na minha vida! Obrigada por tudo! Por tudo que me ensinou, não só profissionalmente, mas como pessoa! Por ter estado ao meu lado em todos os momentos, por ter rezado comigo, por ter cuidado de mim com imenso carinho de mãe! Eu realmente não teria conseguido sem você! Que Deus te abençoe sempre!

Aos amigos do LTA, João, Simone, Valdineia, Lara e Ana Silvia, que estiveram sempre dispostos a me ajudar. A Ana Lúcia (Aninha), por toda ajuda sempre que precisei, pelo café da tarde, por todo carinho que sempre teve comigo!

Agradeço ao meu noivo Murilo, por todo amor, todo carinho, toda paciência e toda dedicação! Eu sei que foi difícil pra você também, mas nós conseguimos! Obrigada por ter suportado minhas ausências e falta de atenção, mas sobretudo, obrigada por ter sempre providenciado tudo que precisei para chegar até aqui! Pelas tardes de final de semana que passou comigo no laboratório e pelas vezes que me consolou quando alguma coisa dava errado! Te amo!

Aos meus amigos, Alinne Mérida, Fabrício Bartolazi, Carolina Abreu, Sayra Casanova, Lívia Godinho, à minha sogra Jacyntha e ao meu cunhado Juniel, por toda torcida e todas as orações! Vocês também contribuíram muito para esta conquista!

Enfim, agradeço a todos que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	xviii
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xxi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 – Objetivo geral .....	3
2.2 – Objetivos específicos .....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 – Histórico da conservação dos alimentos .....	5
3.2 – Antioxidantes naturais e artificiais .....	7
3.3 – Radicais livres (RL) X antioxidantes .....	10
3.4 – Descrição botânica de <i>Capsicum baccatum</i> .....	13
3.5 – Composição química .....	16
....3.6 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 – Material vegetal .....	31

4.2 – Preparo dos extratos .....	36
4.3 – Quantificação dos compostos fenólicos por CLAE .....	38
4.4 – Atividade Antioxidante .....	47
4.4.1 – Método DPPH .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 – Atividade Antioxidante .....	51
5.2 – Teor de fenóis totais .....	56
5.3 – Quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE .....	61
5.3.1 – Gradiente 1 .....	61
5.3.2 – Gradiente 2 .....	89
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos antioxidantes artificiais BHA e do Ácido Cítrico .....	8
Figura 2 – Etapas da autoxidação lipídica. (RH – Ácidos insaturados, R – Radical livre, ROO – Radical peróxido e ROOH – Hidroperóxido. ....	11
Figura 3 – Fruto de <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> . ....	16
Figura 4 – Flor de <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> . ....	16
Figura 5 – Estrutura básica dos flavonoides .....	17
Figura 6: Duas das subclasses dos flavonoides. (6a) Estrutura da Quercetina, (6b) Estrutura da Luteolina. ....	18
Figura 7: Estrutura química de alguns capsaicinoides que ocorrem em maior quantidade no gênero <i>Capsicum</i> . ....	18
Figura 8: Estrutura da vitamina C. ....	20
Figura 9: Estrutura química da vitamina A .....	20
Figura 10: Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). ....	21
Figura 11: Estrutura química de alguns carotenoides presentes em <i>Capsicum baccatum</i> . ....	21
Figura 12: Flavonoide Rutina. ....	23
Figura 13: Estrutura química do ácido cafeico. ....	23
Figura 14: Estrutura química da apigenina. ....	24
Figura 15: Gráfico representando a porcentagem dos compostos mais encontrados em <i>Capsicum baccatum</i> . ....	24

Figura 16: Amostra sendo eluída através da coluna, chegando ao detector e emitindo o cromatograma. ....	27
Figura 17: Esquema geral de um cromatograma e seus componentes. ....	28
Figura 18: Ilustração dos 29 acessos de <i>Capsicum baccatum</i> avaliados neste trabalho. ....	35
Figura 19: Frutos dos diferentes acessos depois de lavados e encaminhados à estufa de circulação de ar a 40 °C .....	36
Figura 20: Frutos sendo triturados e armazenados em sacos de papel. ....	37
Figura 21: Esquema da obtenção dos extratos etanólicos dos frutos de <i>Capsicum baccatum</i> . ....	38
Figura 22: Curva de calibração do ácido cafeico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 1. ....	42
Figura 23: Curva de calibração do ácido clorogênico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 1. ...	42
Figura 24: Curva de calibração do flavonoide rutina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 1. ....	43
Figura 25: Curva de calibração do flavonoide quercetina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 1. ....	43
Figura 26: Curva de calibração do flavonoide apigenina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 1. ....	44
Figura 27: Curva de calibração do ácido cafeico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 2. ....	44
Figura 28: Curva de calibração do ácido clorogênico ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 2. ...	45
Figura 29: Curva de calibração do flavonoide rutina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 2.....	45
Figura 30: Curva de calibração do flavonoide quercetina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 2. ....	46
Figura 31: Curva de calibração do flavonoide apigenina ( $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente 2. ....	46
Figura 32: Mudança de coloração do DPPH devido à sua estabilização. ....	48
Figura 33: Curva de calibração do ácido gálico ( $\mu\text{g/ml}$ ). ....	50
Figura 34: Reação entre o antioxidante sintético BHT e o radical livre DPPH. ..	54
Figura 35: Cromatograma do padrão puro de ácido cafeico (50 $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV. ....	62
Figura 36: Cromatograma do padrão puro de ácido clorogênico (50 $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV .....	63
Figura 37: Cromatograma do padrão puro do flavonoide rutina (50 $\mu\text{g/ml}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV. ....	63
Figura 38: Cromatograma do padrão puro do flavonoide quercetina (50 $\mu\text{g/ml}$ )	

no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV. ....	64
Figura 39: Cromatograma do padrão puro do flavonoide apigenina (50 µg/ml) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.....	64
Figura 40: Estrutura do ácido cinâmico. ....	65
Figura 41: Espectro de UV do ácido cinâmico. ....	65
Figura 42: Bandas de absorção no espectro de UV dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico. (a) espectro de UV do ácido cafeico. (b) espectro de UV do ácido clorogênico. ....	66
Figura 43: Bandas de absorção no UV dos flavonoides. ....	67
Figura 44: Relação de padrões quantificados por número de acessos avaliados. ....	72
Figura 45: Cromatograma do acesso BRS avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	73
Figura 46: Cromatograma do acesso 1417 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	73
Figura 47: Cromatograma do acesso 1490 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	74
Figura 48: Cromatograma do acesso 1492 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, cafeico, rutina e quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	74
Figura 49: Cromatograma do acesso 1494 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, e quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	75
Figura 50: Cromatograma do acesso 1495 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV da rutina e quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	75
Figura 51: Cromatograma do acesso 1500 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, cafeico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	76
Figura 52: Cromatograma do acesso 1573 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina e que foram	

identificados e quantificados no gradiente 1. ....	76
Figura 53: Cromatograma do acesso 1584 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	77
Figura 54: Cromatograma do acesso 1611 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	77
Figura 55: Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	78
Figura 56: Cromatograma do acesso 1616 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	78
Figura 57: Cromatograma do acesso 1628 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, rutina e quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	79
Figura 58: Cromatograma do acesso 1629 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	79
Figura 59: Cromatograma do acesso 1630 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	80
Figura 60: Cromatograma do acesso 1637 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	80
Figura 61: Cromatograma do acesso 1639 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	81
Figura 62: Cromatograma do acesso 1642 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	81
Figura 63: Cromatograma do acesso 1643a avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	82

Figura 64: Cromatograma do acesso 1643b avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, cafeico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	82
Figura 65: Cromatograma do acesso 1704 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	83
Figura 66: Cromatograma do acesso 1714 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	83
Figura 67: Cromatograma do acesso 1732 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	84
Figura 68: Cromatograma do acesso 1733 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	84
Figura 69: Cromatograma do acesso 1737 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1. ....	85
Figura 70: Cromatograma do acesso 1738 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1. ....	85
Figura 71: Cromatograma do padrão puro de ácido cafeico (50 µg/ml) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV. ....	90
Figura 72: Cromatograma do padrão puro de ácido clorogênico (50 µg/ml) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV. ....	91
Figura 73: Cromatograma do padrão puro do flavonoide rutina (50 µg/ml) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV. ....	91
Figura 74: Cromatograma do padrão puro do flavonoide quercetina (50 µg/ml) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV. ....	92
Figura 75: Cromatograma do padrão puro do flavonoide apigenina (50 µg/ml) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV. ....	92
Figura 76: Cromatograma do acesso BRS avaliado por CLAE no gradiente 2 e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados. ....	95

Figura 77: Cromatograma do acesso 1573 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	96
Figura 78: Cromatograma do acesso 1584 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	96
Figura 79: Cromatograma do acesso 1611 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	97
Figura 80: Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE no gradiente 2 e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e cafeico que foram identificados e quantificados. ....	97
Figura 81: Cromatograma do acesso 1616 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido cafeico que foi identificado e quantificado. ....	98
Figura 82: Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	98
Figura 83: Cromatograma do acesso 1637 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	99
Figura 84: Cromatograma do acesso 1643a avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	99
Figura 85: Cromatograma do acesso 1643b avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	100
Figura 86: Cromatograma do acesso 1733 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado. ....	100



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais espécies redoxiativas .....	12
Tabela 2 – Algumas espécies do gênero <i>Capsicum</i> .....	14
Tabela 3 – Dados de passaporte dos 29 acessos de <i>Capsicum baccatum</i> que foram estudados .....	34
Tabela 4 – Gradientes de eluição trabalhados .....	40
Tabela 5 – Padrões utilizados para quantificação .....	41
Tabela 6 – Atividade Antioxidante pelo método DPPH dos extratos etanólicos de cada acesso de <i>Capsicum baccatum</i> e do 2,6-di-(tert-butil)-4-metil-fenol (BHT) .....	53
Tabela 7 – Teste de análise de variância para fenóis totais e resultados de Teste F .....	57
Tabela 8 - Resultados do teor de fenóis totais dos acessos de <i>Capsicum baccatum</i> .....	58
Tabela 9 – Tempos de retenção ( $T_R$ ), comprimento de onda ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) e percentual de área (Área%) dos padrões fenólicos analisados por CLAE .....	62
Tabela 10 – Resultados da quantificação do ácido clorogênico no gradiente 1 .....	68
Tabela 11 - Resultados da quantificação do ácido cafeico no gradiente 1 .....	69
Tabela 12 - Resultados da quantificação do flavonoide quercetina no gradiente 1..	69
Tabela 13 - Resultados da quantificação do flavonoide rutina no gradiente 1 .....	70
Tabela 14 – Comparação dos dados extraídos da literatura com os dados obtidos nos acessos avaliados neste trabalho pelo gradiente 1 .....	88

Tabela 15 - Tempos de retenção ( $T_R$ ), comprimento de onda ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) e percentual de \u00e1rea (\u00c1rea%) dos padr\u00f5es fen\u00f3licos analisados por CLAE no gradiente 2.....	90
Tabela 16 – Resultados da quantifica\u00e7\u00e3o do \u00e1cido clorog\u00eanico no gradiente 2 .....	93
Tabela 17 - Resultados da quantifica\u00e7\u00e3o do \u00e1cido cafeico no gradiente 2 .....	94
Tabela 18 - Resultados da quantifica\u00e7\u00e3o do flavonoide rutina no gradiente 2 .....	94
Tabela 19 – Compara\u00e7\u00e3o dos dados extra\u00eddos da literatura com os dados obtidos nos acessos avaliados neste trabalho pelo gradiente 2 .....	102

## LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade Antioxidante
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
RL	Radicais Livres
ROOR	Radical Peróxido
ROOH	Hidroperóxido
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

ASSIS, M.L.V. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2014. Determinação do Potencial Antioxidante e Quantificação de Compostos Fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira.

Os alimentos, por meio de processos naturais estão sujeitos a uma série de alterações que irão modificar o seu valor nutricional, diminuindo seu tempo de prateleira. Desta forma, as indústrias alimentícias utilizam-se de aditivos químicos sintéticos, como os antioxidantes, para minimizar tais processos. Estudos revelam o potencial carcinogênico destes aditivos. Pesquisas em busca de substâncias com potencial antioxidante a partir de produtos naturais vêm ganhando espaço. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante, o teor de fenóis totais e quantificar por CLAE os ácidos clorogênico e cafeico, e os flavonoides rutina, quercetina e apigenina em 29 acessos de pimentas da espécie *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, visando à utilização destes na indústria de alimentos como um antioxidante natural. Para obtenção dos extratos os frutos foram submetidos a refluxo em Soxhlet com etanol 70% (fruto:solvente, 1:10, p/v) por 4 horas. Para a avaliação da atividade antioxidante foi adotado o método fotolorimétrico do

radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), e os extratos foram avaliados em concentrações de 1000, 100 e 10 µg/ml. Só foi verificada atividade nas concentrações de 100 µg/ml e 1000 µg/ml, sendo considerados os melhores acessos os que apresentaram 100% de atividade, estes foram: BRS, 1490, 1495, 1611, 1613, 1629, 1630, 1633, 1639, 1642, 1643a, 1732, 1738, 1797. A quantificação do teor de fenóis totais foi feita utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato de acordo com o teste de Scott Knott em nível de 5% de probabilidade. Foram obtidos 21 grupos (Grupos A-U) estatisticamente iguais, sendo o grupo A composto pelo melhor resultado, desta forma, verifica-se que no grupo A se observou apenas o acesso BRS, sendo este o que apresentou maior teor de fenóis totais (985,333 mg EAG/g). Para a quantificação dos compostos fenólicos por CLAE, trabalhou-se com dois gradientes de eluição diferentes: gradiente 1 (água ultrapura acidificada e acetonitrila) e gradiente 2 (metanol e água ultrapura acidificada). A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos em cada acesso foram feitas comparando-se os tempos de retenção, os espectros de UV e por meio de coinjeções dos padrões fenólicos comerciais puros. Os 29 acessos foram comparados em nível de 5% de significância, em cada gradiente, pelo teste de Scott Knott. Nos dois gradientes, verificou-se que o ácido clorogênico foi o padrão fenólico quantificado em maior número de acessos em relação aos outros. No gradiente 1, o acesso 1417 (1,5423 mg/g) foi o que apresentou maior teor de ácido clorogênico, o acesso 1490 (0,7422 mg/g), maior teor de ácido cafeico, o acesso 1494 (0,3426 mg/g) maior teor de quercetina e o acesso 1714 (0,8168 mg/g), maior teor de rutina. No gradiente 2, o acesso 1613 apresentou maior concentração de ácido cafeico, o 1633 de ácido clorogênico e o acesso BRS maior teor de rutina. O flavonoide apigenina, não foi identificado e quantificado em nenhum dos acessos nos dois gradientes. Verificou-se que no gradiente 1, foi possível quantificar níveis de padrões fenólicos avaliados em um maior número de acessos, sugere-se que estas diferenças estejam relacionadas devido à diferença de polaridade entre o metanol e a acetonitrila e a outros fatores como viscosidade e faixa de absorção no espectro de UV. Sugere-se que os acessos BRS, 1643a, 1611 e 1613, sejam utilizados como antioxidantes naturais pelas indústrias de alimentos, pois se destacam dos demais acessos, por serem considerados bons antioxidantes e fontes de compostos fenólicos.

## ABSTRACT

ASSIS, M.L.V. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2014. Determination of Antioxidant Potential and Quantification of Phenolic Compounds by HPLC in *Capsicum baccatum* var. *pendulum* accessions. Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira.

Foods, through natural processes are subject to a number of changes that will alter its nutritional value, decreasing its shelf life. Thus, food manufacturers make use of synthetic chemical additives such as antioxidants to minimize such processes. Studies reveal the carcinogenic potential of these additives. Research in search of new compounds with antioxidant potential from natural products has been gaining ground. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity, total phenolic content and HPLC to quantify the chlorogenic acid and caffeic, and flavonoids rutin, quercetin and apigenin on 29 accessions of the species *Capsicum* peppers *baccatum* the germplasm collection of the Centre for Agricultural Sciences and Technology of the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, aiming to use these in the food industry as a natural antioxidant. To obtain extracts of fruits were refluxed in a Soxhlet with ethanol 70 % (fruit: solvent, 1:10, w/v) for 4 hours. For the evaluation of the antioxidant activity was adopted photocolometric method of stable free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilidrazil) , and the extracts were evaluated at concentrations of 1000, 100 and 10 g/ml. Activity was only observed at concentrations of 100 mg / ml and 1000

g/ml, being considered the best accesses those who showed 100% activity, these were: BRS, 1490, 1495, 1611, 1613, 1629, 1630, 1633, 1639, 1642, 1643a, 1732, 1738, 1797. Quantification of total phenols was carried out using the Folin-Ciocalteu and the results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) per gram of the extract according to the Scott Knott test at the 5 % probability. 21 groups (Groups AU) statistically equal (985.333 mg were obtained, with Group A consisting of the best result, thus it appears that in group A was only observed BRS access, and this had the highest total phenolic content GAE/g). For quantification of phenolic compounds by HPLC, we worked with two different elution gradients: gradient 1 (acidified MilliQ water and acetonitrile) and gradient 2 (methanol and water acidified MilliQ). The identification and quantification of the phenolic compounds in each access is done by comparing the retention times, and UV spectra by injection of pure phenolic commercial standards. The 29 accessions were compared to the 5% level of significance in each gradient by the Scott Knott test. In both gradients, it was found that chlorogenic acid was measured in the standard phenolic greater number of accesses in relation to others. The gradient 1, 1417 access (1.5423 mg/g) showed the highest content of chlorogenic acid, Access 1490 (0.7422 mg/g), higher levels of caffeic acid, access 1494 (0.3426 mg/g) higher content of quercetin and access 1714 (0.8168 mg/g), higher concentration of rutin. 2 in the gradient, access 1613 showed higher concentration of caffeic acid, chlorogenic acid and 1633 BRS access higher content of rutin. The flavonoid apigenin has not been identified and quantified in any of the hits in the two gradients. It was found that the gradient 1, it was possible to quantify levels of phenolic patterns evaluated in a larger number of accesses, it is suggested that these differences are due to polarity relations difference between methanol and acetonitrile and other factors such as viscosity and absorption band the UV spectrum. It is suggested that the BRS, 1643a, 1611 and 1613, accesses to be used as natural antioxidants for the food industries, for stand out from other accesses because they are considered good sources of antioxidants and phenolic compounds .

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação do homem em desenvolver métodos eficazes de preservação dos alimentos vem desde a antiguidade. E esta crescente preocupação estende-se até os dias de hoje, pois a indústria de alimentos, devido às exigências dos consumidores, tem como uma das suas principais preocupações a segurança alimentar, a qualidade higiênico-sanitária e nutricional dos alimentos, além de preocupações com a boa aparência, visando sempre desenvolver meios e técnicas eficazes para aumentar o tempo de prateleira de sua produção (Zhong e Shahidi, 2012).

Por meio de processos naturais, os alimentos estão em constantes modificações, onde sofrem alterações químicas, como as reações de oxidações lipídicas por ação do oxigênio e radicais livres, provocando por sua vez o aparecimento de sabores e odores desagradáveis, modificações do valor nutricional e a diminuição de sua vida de prateleira. No intuito de retardar tais processos, a indústria utiliza diversos tipos de aditivos químicos sintéticos que por sua vez, são constantemente questionados quanto aos seus possíveis efeitos negativos à saúde. Estudos revelaram que a exposição prolongada do organismo aos compostos sintéticos poderia ocasionar doenças como o câncer (Castelo-Branco e Torres, 2011; Pitaro et al., 2009; Bozkurt, 2006).

Neste contexto, pesquisas em busca de substâncias com potencial antioxidante, como os compostos fenólicos, originados do metabolismo vegetal, vêm crescendo nos últimos anos e recebido maior atenção da comunidade



científica, visto que estes compostos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, sendo responsáveis pela remoção de radicais livres, neutralizando espécies reativas de oxigênio e desta forma, são de grande importância para a indústria alimentícia, onde atuam principalmente na conservação dos alimentos aumentando o tempo de estocagem, reduzindo as perdas nutricionais e protegendo os alimentos da oxidação (Zhong e Shahidi, 2012).

Há um grande interesse em detectar nas espécies vegetais utilizadas como condimentos, princípios ativos que possuam ação antioxidante e que possam contribuir para aumentar o tempo de prateleira de alimentos, sendo estes produzidos sem danos ao meio ambiente e à saúde humana (Costa et al., 2009). Os condimentos, tais como as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum*, muito usados pelos índios e civilizações antigas para tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar, são utilizados para aumentar o tempo de vida útil de alimentos e são fontes de antioxidantes naturais como a vitamina E, vitamina C e carotenoides (Reifschneider, 2000). Estas pimentas também são ricas em capsaicínides, que são compostos responsáveis pelo sabor pungente ou picante (Carvalho e Biachetti, 2004).

*Capsicum baccatum* var. *pendulum* é uma das espécies do gênero *Capsicum* amplamente consumida no Brasil, sendo este o segundo maior produtor de pimenta do mundo. Porém, existem poucos relatos na literatura sobre sua composição química e principalmente sobre a atividade antioxidante do extrato bruto (Kollmannsberger et al., 2011; Rodriguez-Burruezo, et al., 2010; Kappel et al., 2008).

Dessa forma, é importante o aprimoramento de estudos sobre as pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum*, no intuito de conhecer melhor sua composição química e determinar seu potencial antioxidante para possivelmente, serem utilizadas para ampliar o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios, que certamente irá fornecer um produto de melhor qualidade nutricional.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as atividades antioxidantes e a composição de compostos fenólicos, por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) dos extratos de acessos desta pimenta.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi quantificar substâncias fenólicas por CLAE dos extratos de acessos de *Capsicum baccatum* provenientes do banco de germoplasma do Laboratório de Melhoramento e Genética Vegetal (LMGV) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF/RJ, bem como avaliar o potencial antioxidante dos diferentes acessos da mesma espécie, visando sua utilização na indústria como um aditivo natural para aumentar o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos etanólicos das polpas dos frutos de *C. baccatum*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos diferentes extratos preparados a partir dos frutos de *C. baccatum* pelo método de captura do Radical Livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila);

- Determinar os teores de fenóis totais dos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu;
- Quantificar as substâncias fenólicas dos diferentes extratos das polpas dos frutos de *C. baccatum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Histórico da conservação dos alimentos**

Até o período Neolítico (idade da pedra polida), há cerca de 10 mil anos, o homem caçava e coletava alimentos para satisfazer sua fome imediata, isto é, consumia apenas alimentos frescos. Nesta época, os alimentos mais consumidos eram os frutos, as raízes, os peixes e os insetos, mas mesmo assim, já havia necessidade de armazená-los, pois em alguns dias, a caça não era tão boa e em alguns períodos, os alimentos não eram abundantes (Pereda, et al., 2005).

O homem primitivo já fazia uso de métodos de conservação, como o resfriamento e a secagem. A descoberta do fogo foi um passo muito importante para uma conservação mais eficiente. O homem pendurava sua caça próximo ao fogo e observou-se que desta forma a caça demorava mais tempo para entrar em processo de deterioração. Surgia, então, um novo modo de conservação: a defumação (Dionysio e Meirelles, 2012).

A partir do momento em que a população humana se fixou em uma região, onde começou a plantar e a criar animais, houve uma melhora no suprimento de comida da comunidade. Essa mudança na forma de obter o sustento alterou os hábitos alimentares da população, que passou a contar com um excedente de produção que poderia ser consumido nos períodos de escassez. Iniciou-se assim, uma busca incessante do homem por formas de

conservar esses alimentos excedentes e novos tipos de conservação foram surgindo (Dionysio e Meirelles, 2012).

Destaca-se o importante papel das especiarias como meios de conservação alimentícia. As cozinheiras da época, já utilizavam o cravo, a canela, as pimentas e algumas ervas nos seus derivados pratos não só pelo sabor e aroma que os conferia, mas também por serem excelentes conservantes. As pimentas e os pimentões, em especial, são considerados os primeiros aditivos alimentares utilizados pelos povos antigos do México e da América do Sul, pois além de tornarem os alimentos de sabores mais atrativos, preservavam os mesmos da contaminação por bactérias e fungos patogênicos contribuindo assim, para a longevidade destas civilizações (Reifschneider, 2000).

Muitas dessas especiarias contêm em sua composição química, compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes, por terem a capacidade de doar hidrogênio para radicais livres, tornando esses radicais estabilizados por ressonância (Reifschneider, 2000).

O século XIX foi marcado por uma sociedade cada vez mais urbana, comercial e industrial, onde as populações se distanciavam cada vez mais dos centros produtivos, tendo dificuldade crescente para alimentar-se. Exceto o vinho, o pão, o azeite e alguns poucos alimentos que não se deterioravam rapidamente e, como consequência, comprometiam o crescimento das cidades (Dionysio e Meirelles, 2012).

Diante dos progressos científicos, destaca-se entre seus desafios, o desenvolvimento de técnicas de conservação que aumentassem a durabilidade de gêneros alimentícios, como carne e peixes, para que pudessem ser vendidos a preços baixos (Pereda et al., 2005).

Os tipos de aditivos utilizados para a conservação de alimentos nas indústrias são os antioxidantes e os conservantes. Os antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos e os conservantes aumentam o prazo de validade do produto impedindo ou retardando as ações provocadas por micro-organismos ou enzimas nos alimentos (Ramalho e Jorge, 2006).

Atualmente, com a correria do dia a dia e a falta de tempo da população, os indivíduos buscam cada vez mais alimentos industrializados pela facilidade

de preparo, portanto há uma preocupação das indústrias em aumentar o tempo de prateleira de seus produtos e oferecer o melhor, tanto em qualidade nutricional, quanto em termos de características sensoriais. Surge então a busca incessante por métodos eficazes que retardem reações indesejáveis e que não causem qualquer tipo de patologia aos consumidores. Neste contexto, pode-se citar os antioxidantes naturais, que se apresentam como uma alternativa para muitos casos (Zhong e Shahidi, 2012).

### **3.2 Antioxidantes naturais e artificiais**

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1990), o termo antioxidante refere-se a uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com os níveis de um substrato oxidável, significativamente impede ou inibe a oxidação deste substrato.

Os lipídios nos alimentos estão sujeitos a uma série de reações oxidativas que podem levar a modificações de suas estruturas, afetando o valor nutricional destes alimentos e também os padrões de qualidade, como cor, odor, sabor e textura, tornando-os impróprios para o consumo (Araújo, 2008; Ramalho e Jorge, 2006).

A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que podem ocorrer durante o processamento, a distribuição, o armazenamento e o preparo final dos alimentos. A preservação de alimentos ricos em lipídios tem sido um desafio e dentre as várias estratégias empregadas para controlar a oxidação, a adição de antioxidantes é a abordagem mais eficaz, conveniente e econômica (Zhong e Shahidi, 2012).

Os primeiros registros sobre o retardamento das reações oxidativas por certos compostos foram descritos por Berthollet, em 1797, e depois esclarecidos por Davy Bailey, em 1817 (Ramalho e Jorge, 2006).

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; eficácia em baixas

concentrações (0,001 a 0,01%); compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e a substância e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante deve-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Ramalho e Jorge, 2006; Rafecas et al.; 1998)

A Resolução nº 04 de 24/11/88 relaciona um total de 13 aditivos permitidos classificados como antioxidantes, possíveis de serem adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos (Ministério da Saúde, 1988). Os antioxidantes mais empregados são o butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e em alguns casos, o ácido cítrico (Figura 1). Estes agentes antioxidantes tendem a estabilizar os ácidos graxos em alimentos através da reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica.

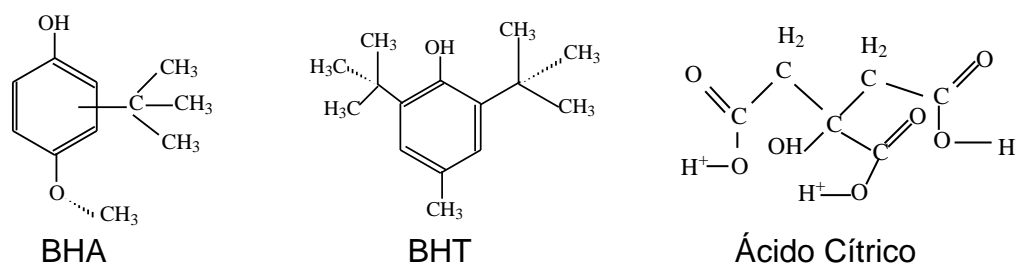


Figura 1: Estrutura dos antioxidantes artificiais BHA, BHT e do Ácido Cítrico.

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico (Naveena, et al., 2008; Nunez et al., 2008; Raghavan e Richards, 2007). Algumas organizações, como a *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO), têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias, de acordo com o resultado de algumas pesquisas científicas (Bozkurt, 2006).

A partir do início dos anos 80 o interesse na busca por antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como aumento do peso do fígado e significativo aumento do retículo endoplasmático (Degáspari, 2005; Melo e Guerra, 2002).

Segundo Kikuzaki e Nakatani (1989), extratos naturais são mais efetivos até que alguns antioxidantes sintéticos. Em determinadas espécies de plantas são encontrados compostos que apresentam poder antioxidante, o que é atribuído principalmente a compostos fenólicos.

A substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, além de apresentar vantagens em relação à saúde dos consumidores, se mostra também vantajoso na funcionalidade industrial, visto que, a maior solubilidade dos antioxidantes naturais tanto em água como em óleo, se torna útil na preparação de emulsões ou em outras formulações necessárias para a utilização em alimentos industrializados (Dorko, 1994).

Portanto, ao selecionar um antioxidante natural para ser utilizado em um produto alimentício, deve-se também avaliar o impacto causado sobre a qualidade deste produto, de forma que sua aplicabilidade não interfira nas características sensoriais e na qualidade nutricional destes produtos, para que se alcance a qualidade desejada pelos consumidores (Karre et al., 2013).

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos, em pequenas concentrações. Desse modo, são capazes de reduzir a velocidade das reações de oxidação de várias substâncias, desta forma, as frutas, os vegetais, os cereais e as especiarias têm despertado o interesse de muitos pesquisadores por apresentarem tais compostos de ação antioxidante em suas composições (Antioxidantes Naturais, 2012).

Os antioxidantes naturais protegem as moléculas contra a ação de radicais livres que iniciam e perpetuam a oxidação, consistem na principal forma de degradação de substâncias (Castelo-Branco et al., 2011). Como exemplo de antioxidantes naturais podem ser citados as vitaminas C e E, os taninos, os flavonoides, os carotenoides, entre outros (Zhong e Shahidi, 2012).



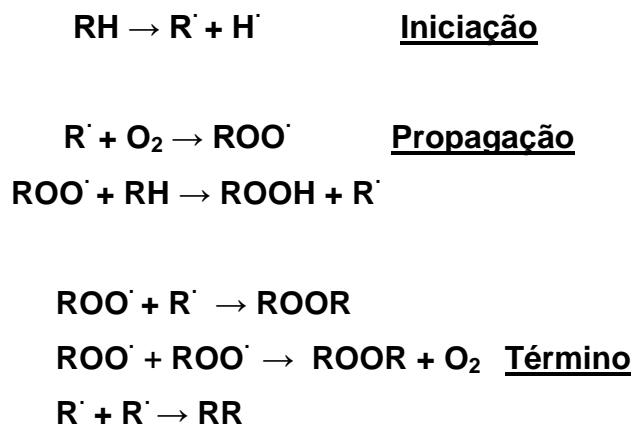
### 3.3 Radicais livres (RL) X Antioxidantes

As reações de oxidação também promovem a degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, que provocam alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos, que podem possuir em suas moléculas elétrons desemparelhados (espécies radicalares) (Araújo, 2008; Ramalho e Jorge, 2006).

De acordo com Araújo (2008), os radicais livres são substâncias químicas que apresentam número ímpar de elétrons, sendo, portanto, altamente energéticos e instáveis; podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa, como luz, calor e radiação. Essa energia externa, ao atingir o átomo, faz com que um elétron seja removido de seu orbital. Esses radicais livres que possuem o elétron desemparelhado e centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

O termo oxidação de lipídios refere-se a uma série de reações químicas complexas, que envolvem ácidos graxos insaturados e oxigênio (Figura 2). Essas reações são divididas em três etapas denominadas fase inicial, fase de propagação e fase terminal. Na fase inicial ocorre a formação dos radicais livres devido à retirada de um hidrogênio de uma molécula de ácido graxo insaturado. Para que este processo ocorra é necessária a presença nos alimentos de variados iniciadores, tais como peróxidos, íons metálicos de transição, luz UV e enzimas (Araújo, 2008; Toledo et al, 1985).

O radical livre formado reage com o oxigênio formando o radical peróxil, que por sua vez, são altamente reativos passando a atuar como propagadores de um processo autocatalítico. A fase terminal ocorre quando há interação de dois radicais livres formando um não radical, finalizando assim sua participação na reação (Araújo, 2008; Toledo et al, 1985).



**Figura 2:** Etapas da autoxidação lipídica (**RH**- Ácidos insaturados; **R<sup>·</sup>** - Radical Livre; **ROO<sup>·</sup>** - Radical peróxido e **ROOH** – Hidroperóxido) Fonte: (Ramalho e Jorge, 2006).

Durante a oxidação dos lipídios, ocorrem simultaneamente diversas reações de decomposição que levam a formação de compostos de baixo peso molecular como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos. Visto que, alguns destes produtos são voláteis, contribuem para a formação do odor característico associado à oxidação dos lipídios (Porter, 2013; Pratt et al , 2011; Frankel , 1991; Frankel , 1984).

Desta forma, a oxidação basicamente envolve a adição de um átomo de oxigênio ou a remoção de um átomo de hidrogênio das moléculas que constituem os alimentos (Araújo, 2008; Pereira, 2008). Os radicais oriundos do oxigênio, do nitrogênio e os não radicais podem ser observados na tabela 1. Esses radicais são os principais responsáveis pelas reações de oxidação de lipídios, proteínas, carboidratos e vitaminas em alimentos (Araújo, 2008).

Então, é comum o uso de substâncias antioxidantes que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (Vicentino e Menezes, 2007).

**Tabela 1 – Principais espécies redoxiativas**

<b>Espécies redoxiativas de oxigênio</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxil ( $HO^{\cdot}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Peroxil ( $ROO^{\cdot}$ )	Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )
Alcoxil ( $RO^{\cdot}$ )	
Hidroperoxil ( $HOO^{\cdot}$ )	
<b>Espécies redoxiativas de nitrogênio</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )
Dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ )	Alquil peroxinitrito ( $ROONO$ )

Fonte: adaptado de Araújo, 2008.

Estes podem ser naturais ou artificiais, os naturais como os terpenoides, as saponinas, os flavonoides, entre outros, podem ser extraídos de inúmeras famílias botânicas, como a *Lamiaceae*, a *Solanaceae*, a *Labiatae* e a *Passifloraceae* dentre outras.

Os antioxidantes fenólicos podem atuar como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. A eficácia dos antioxidantes fenólicos está ligada à presença de grupos volumosos na molécula de fenol pelo seu efeito estérico e estabilizante nas estruturas de ressonância dos radicais (Laguerre et al., 2007).

As espécies do gênero *Capsicum* (*Solanaceae*) que se destacam por apresentarem grande relevância econômica, apresentam em sua composição química substâncias com potencial antioxidante, tais como os carotenoides, o ácido ascórbico, os compostos fenólicos, a vitamina A e os tocoferóis, sendo que estes níveis de compostos podem variar de acordo com o estágio de maturação e com o genótipo (Davis et al., 2007).

Sendo assim, ressalta-se a importância de estudos mais detalhados sobre o teor de compostos fenólicos em espécies de *Capsicum baccatum*

(*Solanaceae*), visto que tais compostos apresentam grande importância para inibir os processos de oxidações lipídicas em alimentos, além de considerar-se a abundância desta espécie em nosso continente, pois se tem notado um aumento da popularidade das pimentas entre os consumidores, prova disto é que a presença desses vegetais tem sido cada vez mais frequente nos supermercados (Conforti et al., 2007).

### 3.4 Descrição Botânica de *Capsicum baccatum*

As espécies de pimentas do gênero *Capsicum* (do grego Kapto, significa morder, picar), têm origem no continente americano e pertencem à família *Solanaceae*, como também o tomate, a batata, a berinjela e o jiló (Castro et al., 2011). As pimentas são vegetais muito valiosos, e seu consumo aumentou em 18% dentre os anos de 2002 a 2006 (Mccarty, 2008), sendo estas, muito conhecidas em várias partes do mundo devido à sua cor, ao sabor, à pungência e ao aroma (Sousa et al., 2006; Pruthi, 1980).

A família *Solanaceae* é composta por mais de 3.000 espécies e destaca-se por suas espécies serem consideradas por muitos pesquisadores e consumidores, importantes fontes alimentícias sendo, portanto foco de muitas pesquisas científicas e de grande interesse econômico, visto que as espécies deste gênero estão dominando o comércio das especiarias picantes em vários países de clima tropical, subtropical e temperado (Mueller et al., 2005).

Dentre as mais de 200 variedades do gênero *Capsicum*, cinco principais espécies são domesticadas e largamente cultivadas e utilizadas pelo homem, no continente americano, incluindo o Brasil: *Capsicum annum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. Pubescens* (Tabela 2). O centro de origem das pimentas do gênero *Capsicum* é o continente americano, elas se desenvolvem em regiões tropicais e temperadas por todo o mundo, e são utilizadas tanto como especiarias quanto como hortaliças (Bae et al., 2012).

**Tabela 2-** Algumas das espécies do gênero *Capsicum*

<b>Algumas espécies do gênero <i>Capsicum</i></b>		
<i>Capsicum annum</i>	<i>Capsicum cornutum</i>	<i>Capsicum leptopodium</i>
<i>Capsicum baccatum</i>	<i>Capsicum dimorphum</i>	<i>Capsicum lycianthoides</i>
<i>Capsicum abbreviatum</i>	<i>Capsicum dusenii</i>	<i>Capsicum luteum</i>
<i>Capsicum breviflorum</i>	<i>Capsicum eximium</i>	<i>Capsicum minutiflorum</i>
<i>Capsicum buforum</i>	<i>Capsicum exile</i>	<i>Capsicum mirabile</i>
<i>Capsicum brasilianum</i>	<i>Capsicum fasciculatum</i>	<i>Capsicum mositicum</i>
<i>Capsicum campylopodium</i>	<i>Capsicum fastigiatum</i>	<i>Capsicum parvifolium</i>
<i>Capsicum cardenasii</i>	<i>Capsicum flexuosum</i>	<i>Capsicum pubescens</i>
<i>Capsicum chacoense</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	<i>Capsicum schottianum</i>
<i>Capsicum chinense</i>	<i>Capsicum galapagoense</i>	<i>Capsicum scolnikianum</i>
<i>Capsicum chlorocladium</i>	<i>Capsicum geminifolium</i>	<i>Capsicum tetragonum</i>
<i>Capsicum ciliatum</i>	<i>Capsicum hookerianum</i>	<i>Capsicum tovarii</i>
<i>Capsicum coccineum</i>	<i>Capsicum lanceolatum</i>	<i>Capsicum villosum</i>

☐ Principais espécies cultivadas do gênero *Capsicum* no continente americano, inclusive no Brasil.

O gênero *Capsicum* apresenta grande variação morfológica, com frutos de tamanhos, formatos, cores e grau de pungência (ardência, característica conferida pela presença de capsaicínoides, principalmente capsaínas, variados (Carvalho e Biachetti, 2004).

A coloração do fruto maduro é geralmente vermelha, podendo variar desde amarelo-leitoso ao roxo ou preto. O formato varia com as espécies, existindo frutos alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, quadrados e campanulados. Por observação de determinadas características e usos, são separados e classificados popularmente como pimentas e pimentões. Assim, os pimentões apresentam frutos grandes e largos (10-21 cm de comprimento x 6-12 cm de largura), formato quadrado a cônico, paladar não pungente (doce). As pimentas apresentam, em sua maioria, frutos menores que os pimentões,

formatos variados e paladar predominantemente pungente (Carvalho e Biachetti, 2004).

As pimentas do gênero *Capsicum*, são largamente utilizadas industrialmente como corantes, aromatizantes, componentes de molhos, sopas, carnes processadas, doces e em bebidas alcoólicas (Kollmannsberger et al., 2011; Pino et al., 2007). Os frutos de pimenta podem ser consumidos (em estágios maduros e imaturos) frescos, secos, em conserva ou na forma de molhos de pimenta e são também muito utilizados na medicina tradicional, devido a suas propriedades antimicrobianas e sedativas (Otero et al, 2000; Cichewicz e Thorpe, 1996).

O Brasil é um dos maiores produtores de pimentas do gênero *Capsicum* do mundo. No ano de 2005, as pimentas deste gênero foram dentre os vegetais, o segundo mais exportado no país, com um volume de exportação de 9.222 toneladas (Embrapa, 2005).

A espécie *Capsicum baccatum* apresenta-se sob duas formas: *Capsicum baccatum* var. *baccatum* (Cumari) e *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. A espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, popularmente conhecida como pimenta “dedo de moça” ou pimenta “Cambuci” é amplamente difundida na América do Sul, inclusive no Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste (Bogusz, et al, 2012).

Os cálices dos frutos maduros são evidentemente dentados e não possuem constrição anelar na junção do pedicelo. Os frutos (Figura 3) são do tipo baga, podendo apresentar várias formas e cores, geralmente quando imaturos possuem a coloração verde e quando maduros a coloração vermelha podendo variar. Com relação à polpa, esta apresenta consistência firme e as sementes se caracterizam pela coloração cor de palha. Suas flores (Figura 4) são isoladas, pequenas, hermafroditas e se apresentam de uma a duas por nó. Na antese, os pedicelos são geralmente eretos. A corola é branca e sempre apresenta um par de manchas amarelas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas e as anteras são amarelas (Carvalho e Biachetti, 2004).



**Figura 3:** Fruto de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*



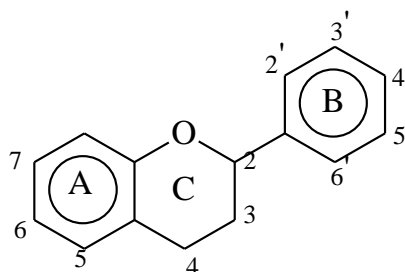
**Figura 4:** Flor de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

### 3.5- Composição química

As espécies do gênero *Capsicum* além de serem utilizadas como especiarias, apresentam também diversas aplicações terapêuticas como para o tratamento de artrite, reumatismo, dor de estômago, erupções na pele, mordidas de cobra, no tratamento de feridas, entre outras (Meghvansi et al., 2010).

Estas diversas aplicações são atribuídas devido à presença de uma grande variedade de substâncias químicas em sua composição, dentre elas

destacam-se os compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Hervert-Hernandez et al., 2010), tais como os carotenoides (Deli et al., 2001), os capsaicinoides (Pino et al., 2007; Ochi et al., 2003; Kirschbaum-Titze et al., 2002; Rosa et al., 2002), os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (Figura 5), dentre eles a quercetina (Figura 6-a), pertencente à subclasse dos flavonóis, contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C e a luteolina (Figura 6-b), que pertence à subclasse das flavonas, contendo apenas carbonila na posição 4 (Kappel et al., 2008; Materska e Perucka, 2005; Marin et al., 2004; Howard et al., 2000).

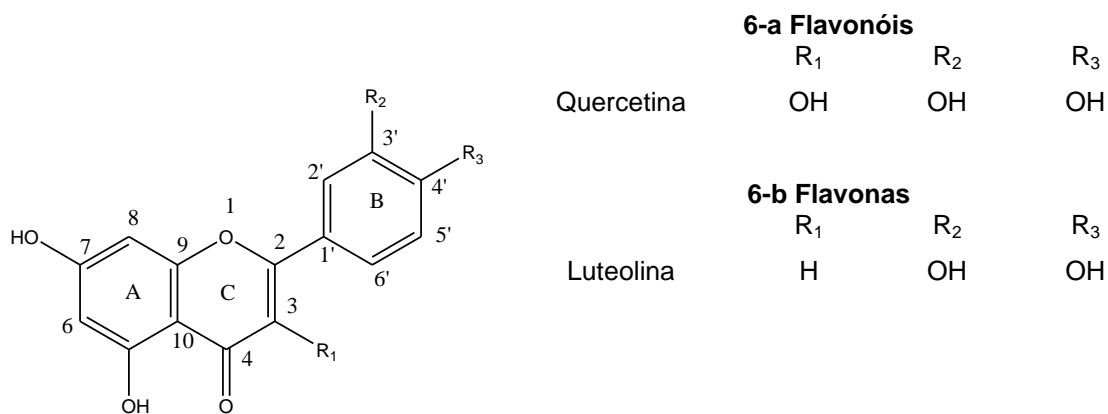


**Figura 5:** Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes entre os metabólitos secundários dos vegetais. O termo “fenólico” ou “polifenol” pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros) (Harborne, 1994).

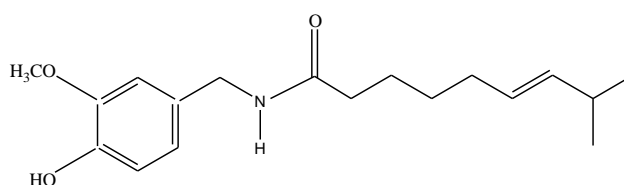
De acordo com as características químicas e biossintéticas, são separados em diversas subclasses: Chalconas, Flavonóis, Flavonas, dihidroflavonoides (Flavanonas e Flavanonóis), Antocianidinas, Isoflavonoides (isoflavonas, isoflavononas, isoflavenos e 3-aril-cumarinas), Auronas, Neoflavonoides, Biflavonoides, entre outros.



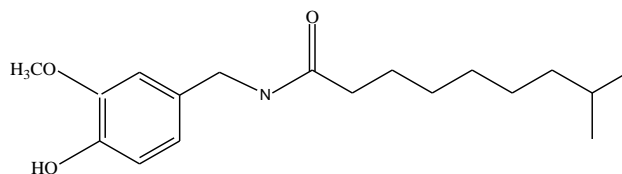


**Figura 6:** Duas das subclasses dos flavonoides. (6-a) Estrutura da Quercetina; (6-b) Estrutura da Luteolina.

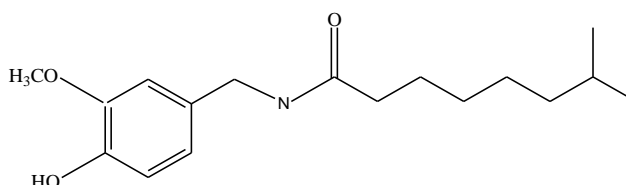
A pungência ou picância das pimentas deve-se à presença dos capsaicinoides (Figura 7) que são os compostos mais estudados das pimentas. São amidas de vanilamina (4-hidróxi-3-metóxi-benzilamina) e ácidos saturados ou insaturados. Este grupo apresenta mais de dez compostos conhecidos, contudo a capsaicina {N-[(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)metil]-8metilnon-6-enamida} é a mais descrita na literatura. Tais compostos são encontrados na placenta dos frutos de pimentas e os que ocorrem em maior quantidade são a capsaicina, a diidrocapsaicina e a nordiidrocapsaicina (Carvalho et al., 1999; Devis et al, 2007).



Capsaicina



Diidrocapsaicina



Nordiidrocapsaicina

**Figura 7:** Estrutura química de alguns capsaicinoides que ocorrem em maior quantidade no gênero *Capsicum*.

Algumas pesquisas mostram que pimentas cultivadas no período que compreende a primavera e o verão são mais pungentes do que as cultivadas no período do outono e inverno. Tal fenômeno ocorre devido a fatores de estresse que afetam a síntese de capsaicinoides (Kirschbaum-Titze et al., 2002).

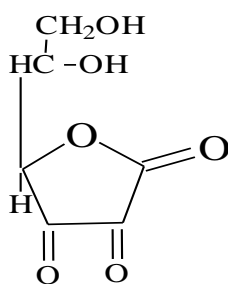
O conteúdo de capsaicinoides também sofre interferência em relação ao processo de amadurecimento. E este fato de haver maior ou menor conteúdo de capsaicinoides pode proporcionar interferências na dispersão das sementes, já que conteúdos elevados destes compostos resultam em frutos mais pungentes. Com isso, a capsaicina desencoraja a maioria dos dispersores, sendo os pássaros um dos poucos animais indiferentes a estes compostos, portanto os maiores dispersores destas sementes (Tewksbury e Nabhan, 2001).

Estudos conferem à capsaicina, dentre outras atividades, propriedades anti-inflamatórias (Surh et al., 2002) e antioxidantes (Ganji e Kafai, 2004; Surh et al., 2002), além de efeito quimiopreventivo (Surh et al., 2002; Lee et al.,

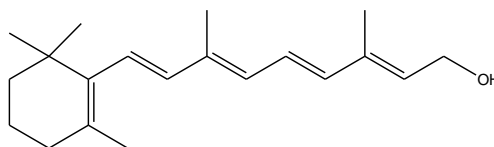
2005) e efetivos no tratamento de dor associada com artrite, cistite e neuropatia diabética (Nuez, 1995).

As pimentas do gênero *Capsicum* são fontes de antioxidantes naturais, tais como a vitamina C (Figura 8), vitamina A (Figura 9), vitamina E (Figura 10) e carotenoides.

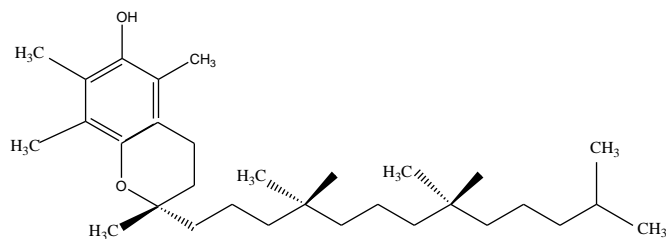
A vitamina C (ácido ascórbico) é muito consumida pelos seres humanos, sendo também adicionada a muitos produtos alimentares para inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos (Moraes e Colla, 2006). Já a vitamina E é a principal vitamina antioxidante transportada na corrente sanguínea pela fase líquida das lipoproteínas, é um componente dos óleos vegetais e atua na proteção dos lipídios no processo de peroxidação. Suas propriedades antioxidantes são estudadas há aproximadamente 60 anos (Cerqueira, 2007).



**Figura 8:** Estrutura química da Vitamina C.

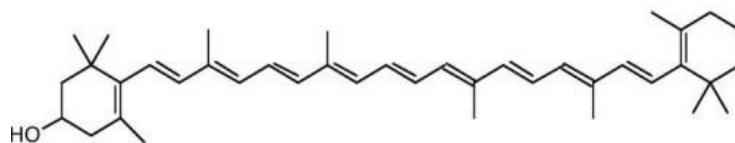


**Figura 9:** Estrutura química da Vitamina A.

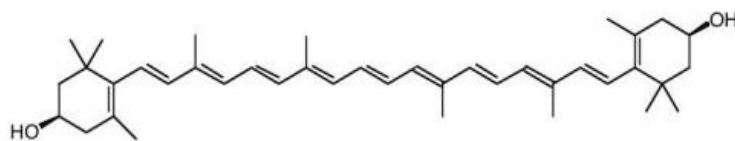


**Figura 10:** Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)

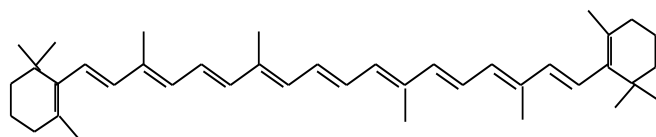
A pimenta *Capsicum baccatum* var. *pêndulum* é amplamente consumida no Brasil, e há poucos relatos na literatura sobre, no que diz respeito a sua composição de carotenoides (Figura 11), flavonoides, bem como a atividade antioxidante do seu extrato bruto (Kollmannsberger et al., 2011; Rodriguez-Burruezo et al., 2010; Kappel et al., 2008).



Criptoxantina



Zeaxantina



$\beta$ -caroteno

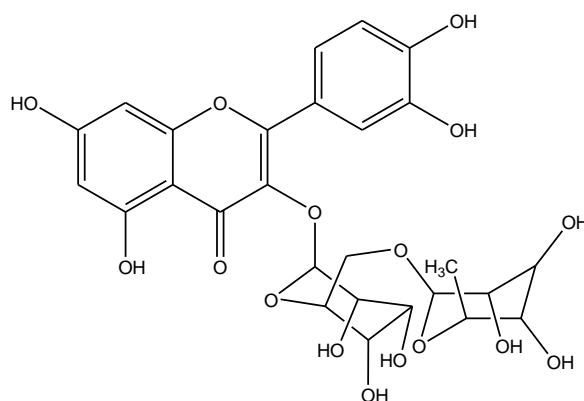
**Figura 11:** Estrutura química de alguns carotenoides presentes em *Capsicum baccatum*.

Os carotenoides são amplamente encontrados em plantas e são os responsáveis pela cor de frutas e vegetais. São isoprenoides, constituídos geralmente por 8 unidades de isopreno, formando uma grande cadeia de polieno que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, permitindo a configuração cis e trans (Fraser e Bramley, 2004). Atuam no sistema de duplas ligações conjugadas, facilitando a captação de radicais livres, principalmente o radical alquilperoxila (Tapiero et al., 2004).

Os pigmentos, como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno, por exemplo, funcionam como antioxidantes naturais e têm capacidade de proteger membranas, DNA e outros constituintes celulares contra danos oxidativos (Gomes, 2007).

Em um estudo preliminar realizado por Spiller et al., (2008), sobre a atividade antioxidante do extrato bruto de *Capsicum baccatum*, foi possível avaliar o conteúdo de fenóis totais, flavonoides e a presença de capsaicina. Mais recentemente, no trabalho de Zimmer et al., (2012), também foi possível avaliar teores destes mesmos compostos, embora não tenham encontrado concentrações de rutina e quercetina, foi possível relacionar o teor de fenóis totais com a atividade antioxidante deste extratos a partir de frutos e sementes de *Capsicum baccatum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE),

A rutina (Figura 12) destaca-se por apresentar grande importância terapêutica em melhorar a resistência e permeabilidade dos vasos capilares, além de se destacar por sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. É um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido muito pesquisada e os resultados vêm atraindo constantemente as indústrias farmacêuticas (Pedriali, 2005).



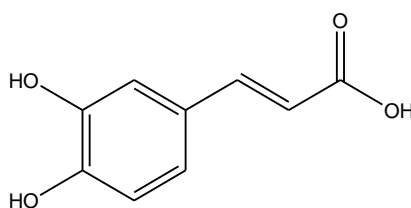
**Figura 12:** Flavonoide rutina

Manach et al., (1997) demonstraram que a rutina foi completamente hidrolisada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a quercetina 3-glicosídica e a quercetina aglicona.

Segundo os estudos de Afanas`ev et al. (1989), que pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, concluiu-se que estes flavonoides possuem uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina.

Ainda nos estudos de Zimmer et al., (2012), foi observado que os frutos de *Capsicum baccatum* apresentaram maior teor de flavonoides e compostos fenólicos do que as sementes, e esses conteúdos podem ser correlacionados com a atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

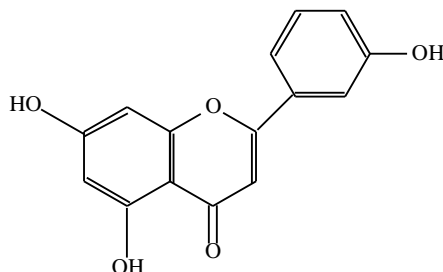
Nos dados verificados nas análises por CLAE por Kappel et al., (2008) a partir da espécie *Capsicum baccatum*, foi demonstrada a presença de compostos fenólicos como a rutina, o ácido cafeico (Figura 13) e o clorogênico, na maioria dos extratos avaliados, sendo que para esta mesma espécie não foi verificada a presença de capsaicina, onde diferenças como estas, podem ser atribuídas de acordo com a variedade, com o grau de maturação da planta, bem como sua origem geográfica e os tipos de métodos analíticos de extração utilizados (Zimmer et al., 2012).



**Figura 13:** Estrutura química do ácido cafeico.

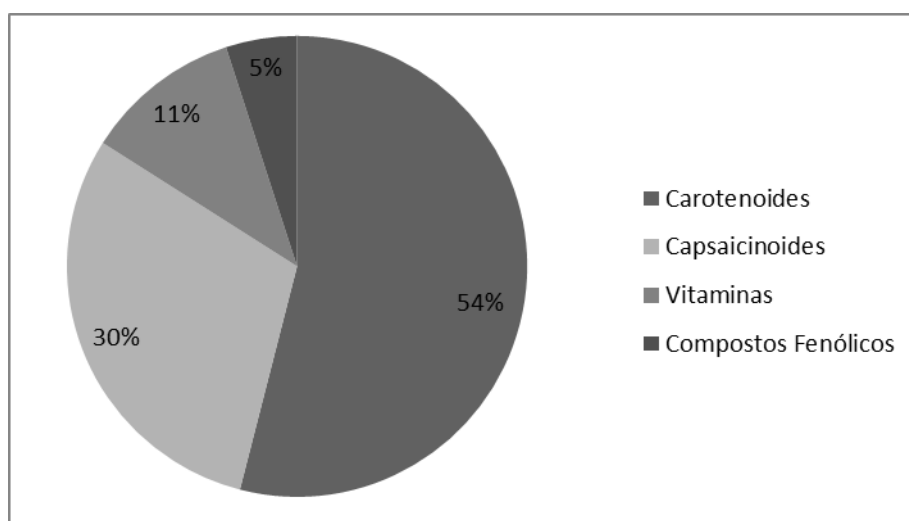
Wahyuni et al., (2011), ao analisar a biodiversidade metabólica de 32 acessos de espécies do gênero *Capsicum*, observaram novamente a presença

dos flavonoides quercetina, luteolina e poucos resquícios de apigenina (Figura 14), além de carotenoides, capsaicinoides e vitaminas como A, C e E.



**Figura 14:** Estrutura química da apigenina.

Portanto, vale ressaltar que nesta espécie de pimentas, segundo trabalhos anteriores, já foram identificados, dentre outros compostos não citados, os carotenoides, os capsaicinoides, as vitaminas A, C e E, além dos compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonoides e alguns ácidos fenólicos. E estes compostos em relação à abundância, de acordo com as citações na literatura podem ser dispostos conforme a Figura 15.



**Figura 15:** Gráfico representando a porcentagem dos compostos mais encontrados em *Capsicum*.

Observa-se que os carotenoides constituem a classe de compostos majoritários em pimentas desta espécie, seguidos dos capsaicinoides, das vitaminas e dos compostos fenólicos, que por sua vez são minoritários, porém ainda assim, ressalta-se a importância de se determinar os teores destes compostos, frente aos seus já citados potenciais antioxidantes.

Conforme, pôde-se observar nos demais trabalhos citados, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada na quantificação e identificação de compostos fenólicos, por ser uma técnica eficiente ao realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de substâncias em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

### **3.6- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A primeira análise em um cromatógrafo líquido automático com gradiente de eluição foi descrito por Moore et al., (1958). Mas, foi somente a partir dos anos 70 que se conseguiu um avanço considerável nas técnicas cromatográficas, conseguindo-se o nível de sofisticação que a CLAE apresenta atualmente, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia (Skoog et al., 2002; Spackman et al., 1958).

O avanço foi mais significativo quando se tornou possível a construção de colunas recheadas com partículas cada vez menores, necessárias para uma alta resolução e tornou-se também possível se adquirir equipamentos capazes de trabalhar em altas pressões, necessárias para se obter uma boa velocidade de eluição (Skoog, et al., 2002).

A Cromatografia é uma das técnicas mais empregadas em diversas indústrias como alimentícias, farmacêuticas, petroquímicas e laboratórios de análises clínicas, etc., onde frequentemente é necessário purificar, isolar ou quantificar substâncias de misturas muito complexas. Sendo esta a técnica mais apropriada para uma separação mais eficiente de extratos brutos como também para controlar a pureza final de compostos isolados (CRQ, 2010).

A técnica consiste em separar diversos constituintes de uma mistura seja para quantificação ou identificação de compostos. A separação dá-se por



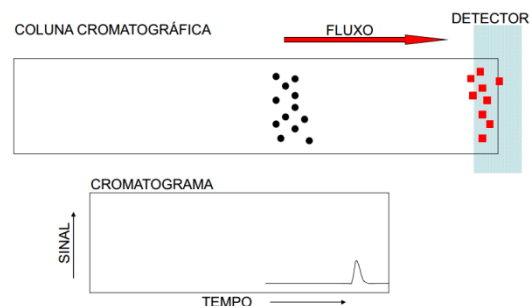
meio de uma fase estacionária, em que a amostra é carregada por intermédio de um fluido denominado fase móvel (Skoog, et al., 2002; Simpson, 1978).

A fase estacionária é constituída de colunas em aço inox muito mais estreitas que as convencionais, apresentando diâmetro interno em torno de 2 a 5 mm, empacotadas com partículas muito pequenas (3-10  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel, por sua vez, circula sob alta pressão ao longo da coluna com fluxo controlado. Esta alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de fases estacionárias constituídas por partículas cada vez menores permite uma elevada eficiência na separação (Skoog et al., 2002; Simpson, 1978).

De acordo com o tipo do recheio da coluna, pode-se dizer que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência pode ser dividida em dois grupos: em fase normal e em fase inversa. Na cromatografia em fase normal tem-se uma fase estacionária polar e conseqüentemente uma fase móvel apolar. Às separações em fase inversa tem-se uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, este sistema se baseia em forças atrativas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados a um suporte de sílica (Gomes, 2010).

Após a amostra ser introduzida no sistema cromatográfico, seus componentes se distribuem entre as duas fases e de acordo com a interação entre estes componentes dá-se a separação dos constituintes analisados e o detector regista o resultado na forma de um cromatograma como pode ser visto na Figura 16 (Simpson, 1978).

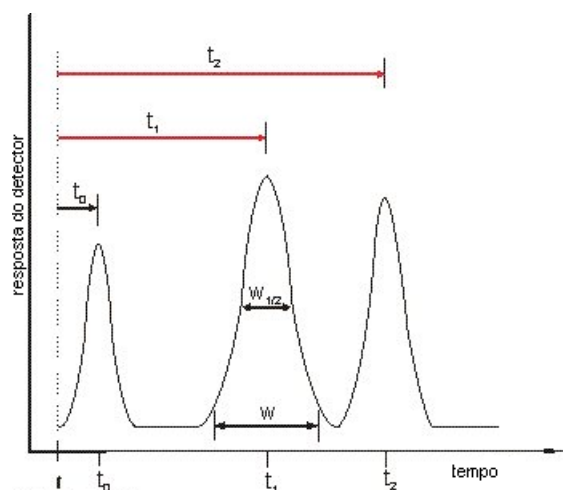
Desta forma, o cromatograma (Figura 17) é a resposta do detector na forma de gráfico, representando assim, a concentração do analito no efluente em função do tempo ou do volume de eluição. Sendo que, as substâncias com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente, já as substâncias com pouca afinidade com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Assim, pode-se dizer que, nas cromatografias em fase reversa, os compostos apolares permanecem mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel (Gomes, 2010; CRQ, 2010).



**Figura 16:** Amostra sendo eluída através da coluna, chegando ao detector e emitindo o cromatograma.

Fonte: < [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos\\_hplc\\_2010.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf)>. Acessado em 16 de dezembro de 2013.

Em relação à composição da fase móvel em uma análise cromatográfica, tem-se que quando a concentração da fase móvel é alterada ao longo de uma corrida cromatográfica, trata-se de uma eluição em gradiente. Nos casos em que a concentração da fase móvel se mantém constante durante toda a análise o tipo de eluição é conhecido como isocrático.



**Figura 17:** Esquema geral de um cromatograma e seus componentes.

Fonte: Gomes, 2010

Vários parâmetros de um cromatograma caracterizam o processo de separação das substâncias de uma mistura. Dentre estes parâmetros pode-se citar (Gomes, 2010):

- $t_0$  (tempo morto da coluna): é o tempo em que um soluto que não foi retido na coluna demora para ser eluído, ou seja, é quanto demora para sair um soluto que não possui afinidade pela coluna;
- $t_R$  (tempo de retenção): é o quanto demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna ( $t_1$  e  $t_2$  na Figura 17);
- $w_{1/2}$  : largura do pico a meia altura;
- $w$  (largura do pico): resultante da interseção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico;
- $k = (t_R - t_0) / t_0 = (t'_R / t_0)$  (fator de retenção): é um parâmetro termodinâmico que fornece uma medida relativa do tempo em que o analito permanece na fase estacionária e na fase móvel.

São inúmeras as vantagens da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, dentre elas, cabe ressaltar que são obtidos tempos de retenção mais curtos e conseqüentemente maiores números de análises por espaço de tempo, e por utilizar menor quantidade de fase móvel, permite a utilização de solventes tóxicos, caros ou até mesmo raros (Simpson, 1978).

Além disto, esta técnica ainda pode estar acoplada a uma série de detectores, fornecendo uma separação ainda mais eficiente e fornecendo informações valiosas sobre a fórmula estrutural dos compostos, contemplando sua eficácia na identificação de compostos. Dentre estas formas de acoplamento, destaca-se o acoplamento ao Espectrômetro de Massas (LC/Ms) e ao Ultravioleta (LC/UV), que são técnicas que fornecem informações muito mais valiosas e em curto espaço de tempo, quando comparadas à Espectrometria de Massas e ao sistema Ultravioleta isoladamente, ou seja, em se falando de produtos naturais, o acoplamento permite uma completa caracterização espectroscópica de diferentes metabólicos de uma mistura complexa em uma única análise.

Devido a estas inúmeras potencialidades, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), tem sido nos últimos anos a técnica mais empregada na

análise de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e suas demais subclasses (Dutra e Ribani, 2009).

Os flavonoides são o grupo de compostos fenólicos mais encontrados em plantas e vegetais e são consideravelmente citados na literatura, devido aos seus benefícios proporcionados a saúde humana, dentre eles destaca-se seu potencial antioxidante e suas propriedades biológicas (Androutsopoulos et al , 2010; Lisa et al , 2010; Plochmann et al, 2007; Boue et al, 2003).

Há registros de que a técnica de CLAE foi utilizada pela primeira vez para a determinação de flavonoides em 1976 por Fischer e Wheaton (Bruggink, 2000). Posteriormente, diversas outras técnicas foram propostas para a separação e determinação de flavonoides e compostos fenólicos em geral (Bruggink, 2000).

As análises que envolvem este tipo de compostos são realizadas normalmente em colunas de fase inversa C18, e as diferenças nas características dos métodos de identificação e quantificação estão associadas com o sistema de detecção e eluição (Gomes, 2010).

Sendo assim, este trabalho objetiva comparar os compostos fenólicos dos acessos de *Capsicum baccatum*, bem como sua capacidade antioxidante, para avaliar qual dos acessos da espécie vegetal possui melhor correlação, o que poderá justificar o uso deste vegetal na indústria de alimentos com o intuito de aumentar o tempo de vida de prateleira de alguns produtos alimentícios.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), pertencente à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

### 4.1 Material vegetal

As sementes inicialmente foram depositadas na casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV). Os frutos maduros foram retirados da planta e acondicionados em sacos de papel devidamente identificados, onde seguiram para as análises no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA).

O material vegetal foi constituído de 29 acessos de *Capsicum baccatum* e um genótipo testemunha (BRS- Mari) da coleção de germoplasma do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Tabela 3 e Figura 18).

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor (poliestireno) de 200 células preenchidas com substrato comercial (Basaplant). Quando

apresentaram 2 pares de folhas definitivas foram transplantadas para copos plásticos e após 30 dias foram transplantadas para vasos plásticos de 5 L de capacidade.

A adubação e os demais tratamentos culturais foram realizados conforme as recomendações de manejo usual para a cultura (Filgueira, 2008).

**Tabela 3** - Dados de passaporte dos 29 acessos de *Capsicum baccatum* que foram estudados, pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

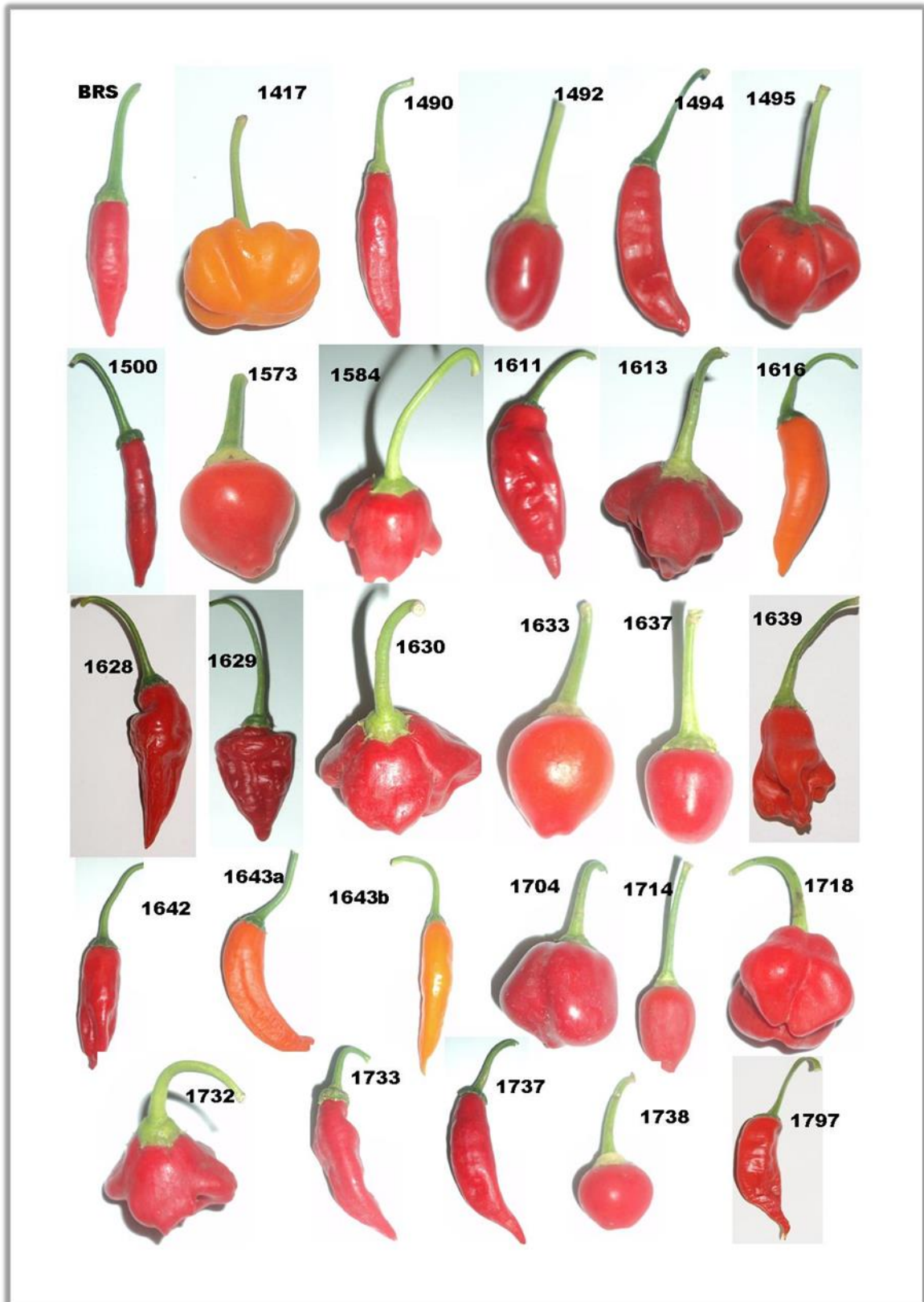
<b>Nº UENF</b>	<b>Espécie</b>	<b>Variedade ou cultivar</b>	<b>Procedência</b>
1417	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	UFLA – MG
1490	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Coleta – RJ
1492	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Coleta – RJ
1494	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Coleta – RJ
1495	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Coleta – RJ
1500	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Coleta – RJ
1573	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Duas Barras – RJ
1584	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Rio das Ostras
1611	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1613	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1616	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1628	<i>Capsicum baccatum</i>	Dedo de moça	Campos dos Goytacazes – RJ
1629	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Campos dos Goytacazes – RJ
1630	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta Cambuci	Campos dos Goytacazes – RJ

Tabela 3, cont.

1633	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Campos dos Goytacazes – RJ
1637	<i>Capsicum baccatum</i>	Pantaneira	Miranda –MS
1638	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Manhuaçu/MG
1639	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimentão Cambuci	Feltrin Sementes
1642	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1643 <sup>a</sup>	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1643b	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa – MG
1704	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa
1714	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Peru
1718	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Renascença/ PR
1732	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Campos dos Goytacazes /RJ
1733	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Campos dos Goytacazes /RJ
1737	<i>Capsicum baccatum</i>	Cayenne	Cachoeira de Macacu/RJ
1738	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa
1797	<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta	Viçosa

---





**Figura 18:** Ilustração dos 29 acessos de *Capsicum baccatum* avaliados neste trabalho.

#### 4.2- Preparo dos extratos.

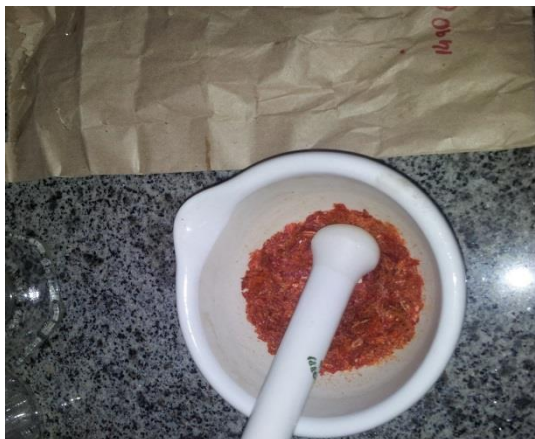
O método de extração adotado foi adaptado de Zimmer et al (2012), em que optou-se pela produção de oleorresinas. A oleorresina é um extrato obtido com solvente orgânico que apresenta substâncias responsáveis pela pungência e por conter substâncias que podem atuar como antioxidantes, além de ser estéril e estável durante o armazenamento. A aplicação destas em alimentos se justifica tanto para conferir sabor, quanto para aumentar a estabilidade oxidativa dos lipídios, aumentando a vida de prateleira destes alimentos (Bizzo et al, 2004).

Inicialmente, os frutos foram limpos, separados manualmente das sementes e levados à estufa de circulação de ar a 40 °C durante sete dias (Figura 19).



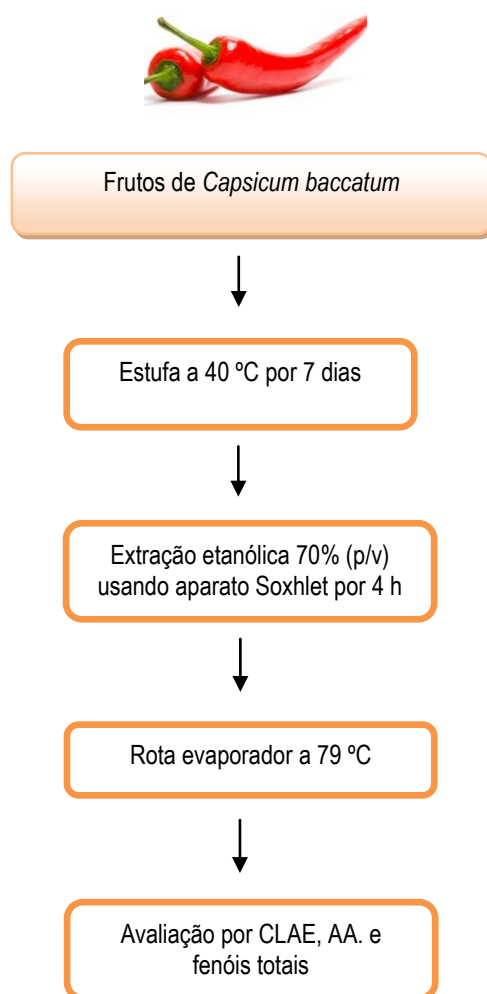
**Figura 19-** Frutos dos diferentes acessos depois de lavados e encaminhados à estufa de circulação de ar a 40 °C.

Após secos, os frutos foram triturados com o auxílio de almofariz e pistilo e armazenados, ao abrigo da luz, em sacos de papel devidamente identificados até seguirem para a extração (Figura 20).



**Figura 20-** Frutos sendo triturados e armazenados em sacos de papel

Para o preparo desses extratos etanólicos, após secos e triturados, os frutos foram submetidos à extração em Soxhlet com etanol 70% (fruto:solvente, 1:10, p/v) por 4 horas. Os extratos foram evaporados em rota evaporador a 79 °C, armazenados em frascos de vidro ao abrigo da luz e refrigerados, de onde seguiram para as demais análises, conforme mostrado na figura 21.



**Figura 21:** Esquema da obtenção dos extratos etanólicos dos frutos de *Capsicum baccatum*. CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. AA - Atividade Antioxidante

#### 4.3- Quantificação dos compostos fenólicos por CLAE

A quantificação dos compostos fenólicos dos extratos etanólicos obtidos de cada acesso foi feita utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com a polaridade do extrato utilizando sistemas de eluição apropriados. Esta é uma técnica valiosa, pois apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos, dependendo do detector utilizado, resposta independente da fase móvel, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004).

Os padrões (ácidos fenólicos e flavonoides) e os extratos obtidos das amostras foram analisados no equipamento Shimadzu, modelo LC-20A, com as bombas LC20AD, sendo os cromatogramas monitorados com variação de 230-400 nm para compostos fenólicos (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M20A) e com volume de injeção de 20 µL. Foi utilizada a coluna de fase reversa RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm).

Para a análise e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides, foram testados dois tipos de gradientes de eluição (Tabela 4), a fim de se determinar em nível de comparação o maior limite de quantificação destes compostos.

Os sistemas de solventes utilizados foram: para o primeiro gradiente de eluição testado, trabalhou-se com água MiliQ acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) na bomba A e acetonitrila na bomba B, com fluxo de 1 ml/min a 35 °C. Para o segundo gradiente de eluição, trabalhou-se com MeOH na bomba A e água MiliQ acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) na bomba B, também com fluxo de 1 ml/min e a 35 °C.

Na preparação das amostras a serem injetadas, pesou-se 10 mg de extrato e solubilizou-se em 1 mL da fase móvel, sendo que para este 1 ml, foram pipetados 500 µL da fase móvel contida na bomba A e 500 µL da fase móvel contida na bomba B, seguindo este procedimento para os dois gradientes. Os vinte e nove extratos foram filtrados com o auxílio de microfiltros (Sartórios) e seringas descartáveis (BD Plastipak), depois foram aplicados três vezes, para cada método, no cromatógrafo.

Os compostos fenólicos quantificados foram ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, quercetina e apigenina (Tabela 5). A escolha destes foi feita com base em uma revisão de literatura criteriosa, em que se constatou a presença destas substâncias fenólicas em pimentas da espécie *Capsicum baccatum*, alvo de nosso estudo, visto que, nos últimos anos, têm-se constatado uma maior procura e preferência dos consumidores pelas pimentas, e cada vez mais nota-se um grande número de variedades disponíveis nos supermercados, tanto de cultivares consumidas como vegetais quanto de cultivares quentes, usadas como especiarias (Conforti et al., 2007). Além de se considerar o potencial antioxidante e conseqüentemente o poder inibitório dos processos de oxidações lipídicas em

alimentos, destas classes de substâncias fenólicas, sendo este o principal objetivo deste trabalho.

**Tabela 4 – Gradientes de eluição trabalhados**

<b>Gradiente 1- Bomba A: água MiliQ acidificada; Bomba B: Acetonitrila</b>	
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração da bomba B (%)</b>
0,01	0
5,00	30
10,00	50
15,00	70
20,00	80
25,00	90
30,00	100
32,00	0

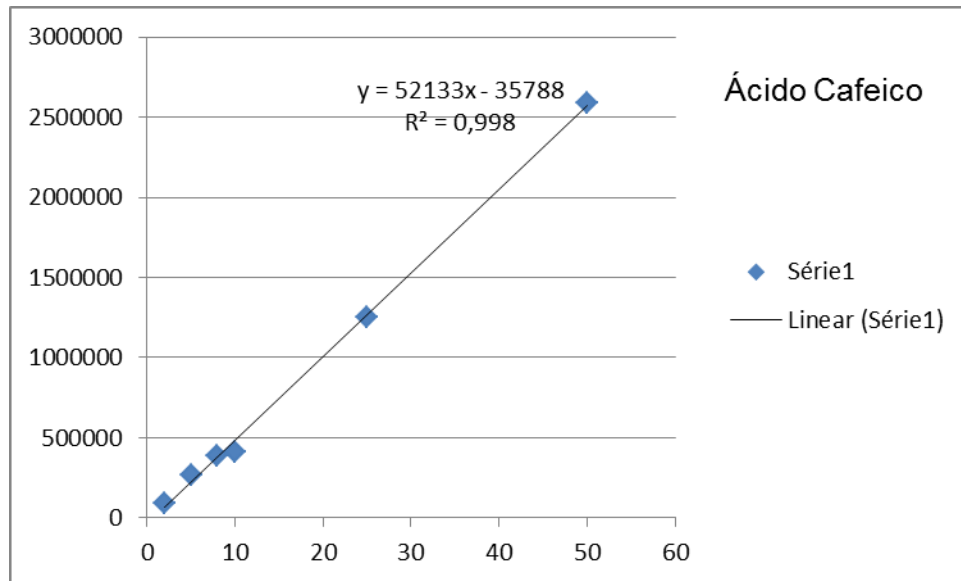
  

<b>Gradiente 2- Bomba A: MeOH; Bomba B: água MiliQ acidificada</b>	
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração da bomba B (%)</b>
0,01	50
2,00	30
22,00	32
30,00	35
33,00	40
35,00	70

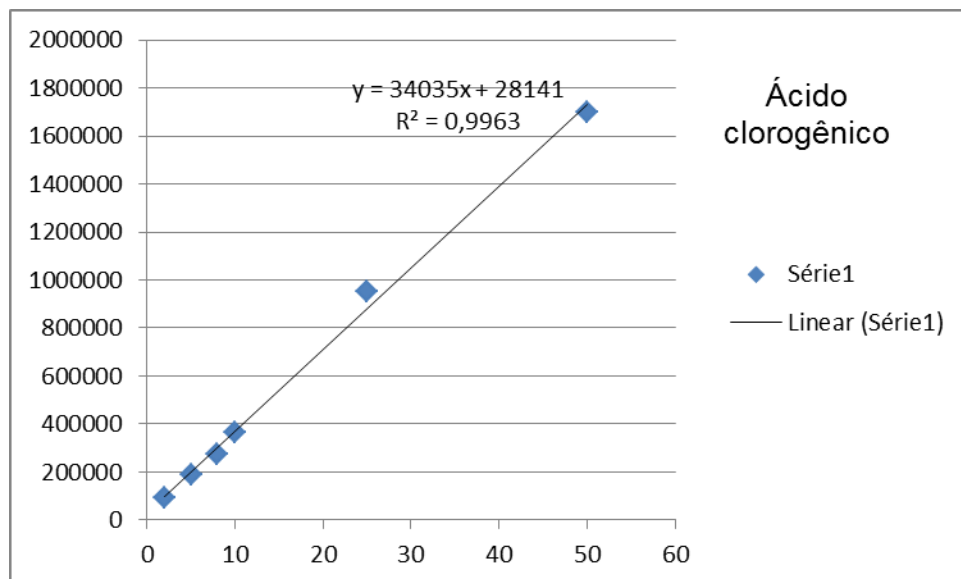
**Tabela 5** - Padrões Fenólicos utilizados para quantificação

<b><i>Padrões fenólicos</i></b>	<b><i>Marca</i></b>
Ácido Cafeico	Tedia Brasil
Ácido Clorogênico	Sigma-Aldrich
Rutina	Merck
Quercetina	Merck
Apigenina	Sigma-Aldrich

Para cada um destes padrões fenólicos foram feitas curvas de calibração (área do pico X massa em  $\mu\text{g}$ ) com seis concentrações diferentes (50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  e 2  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 22-31). Estas concentrações foram definidas com base em concentrações encontradas por outros pesquisadores em análises realizadas por CLAE nesta mesma espécie de pimenta. Foram trabalhadas as mesmas concentrações para os dois gradientes lineares.

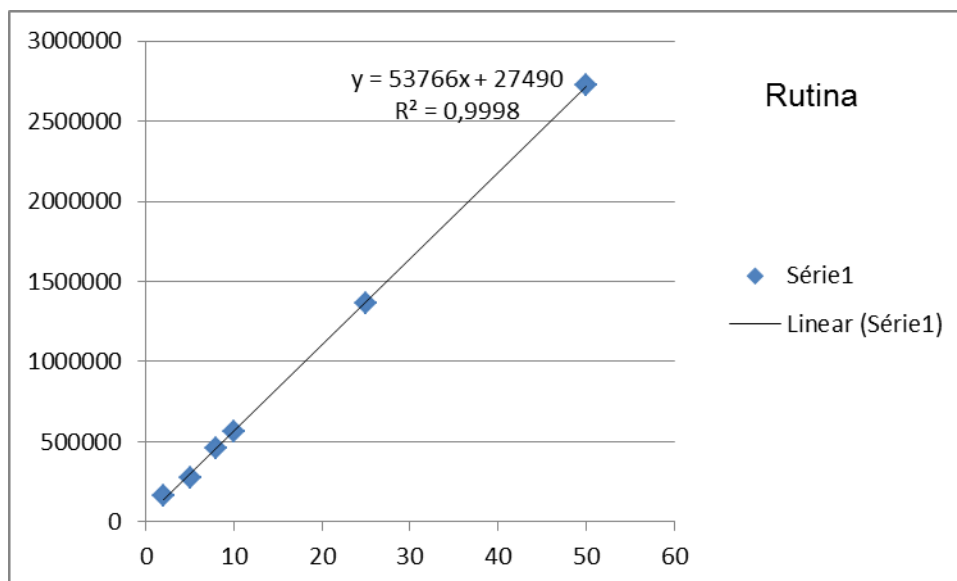


**Figura 22:** Curva de calibração do ácido cafeico (µg/mL) no gradiente 1

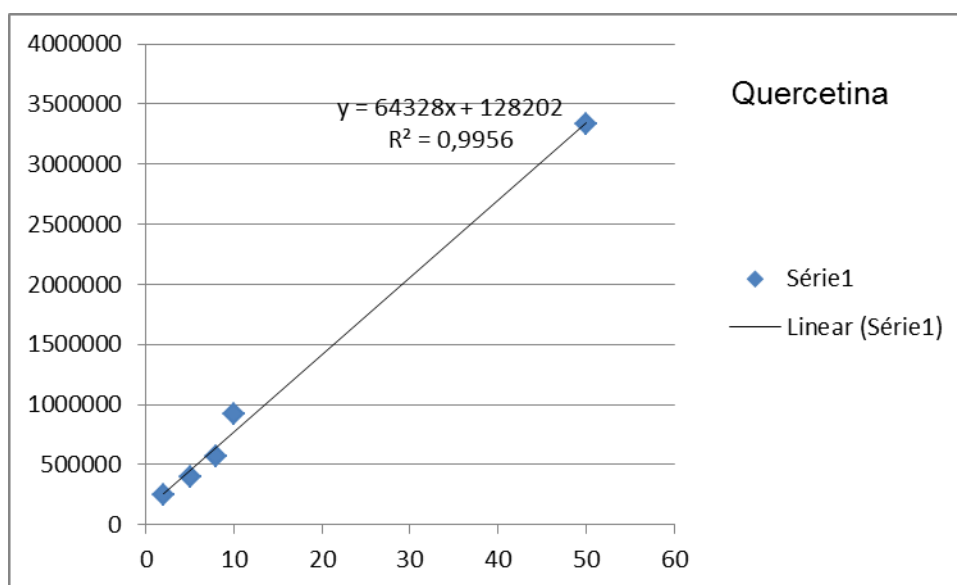


**Figura 23:** Curva de calibração do ácido clorogênico (µg/mL) no gradiente 1

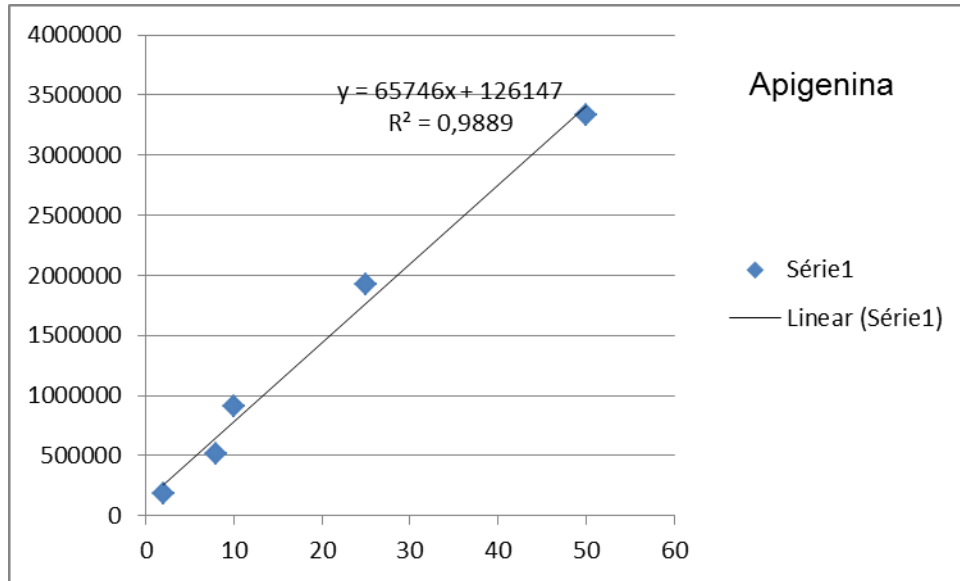




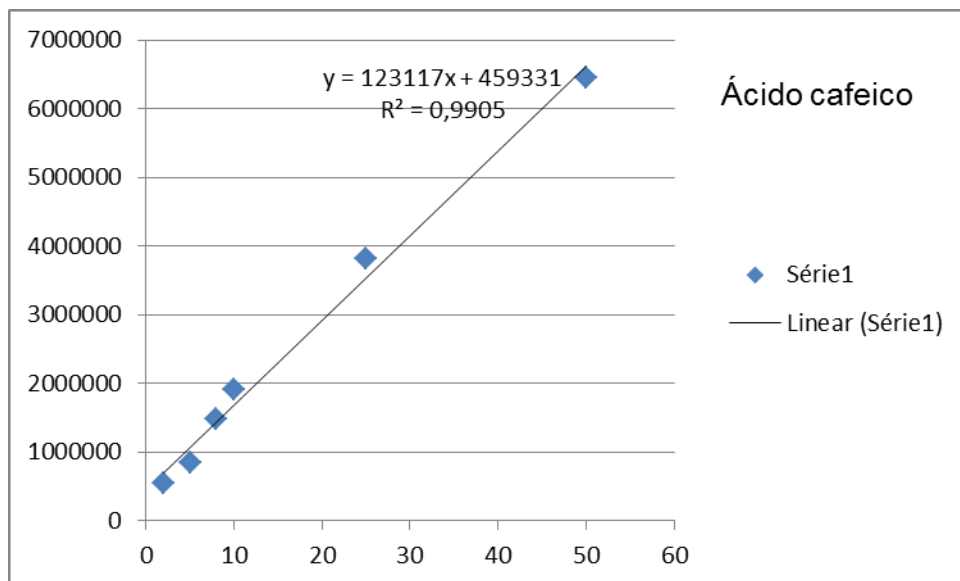
**Figura 24:** Curva de calibração do flavonoide rutina ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 1



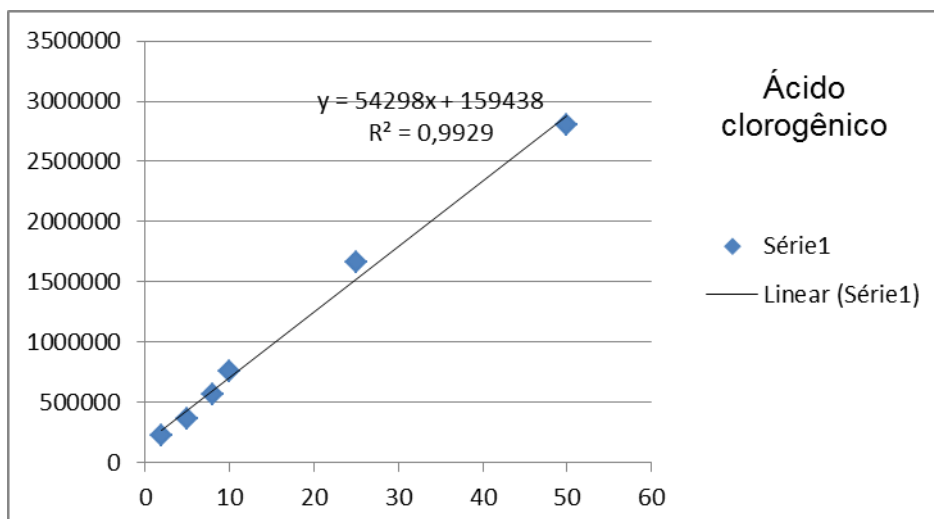
**Figura 25:** Curva de calibração do flavonoide quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 1



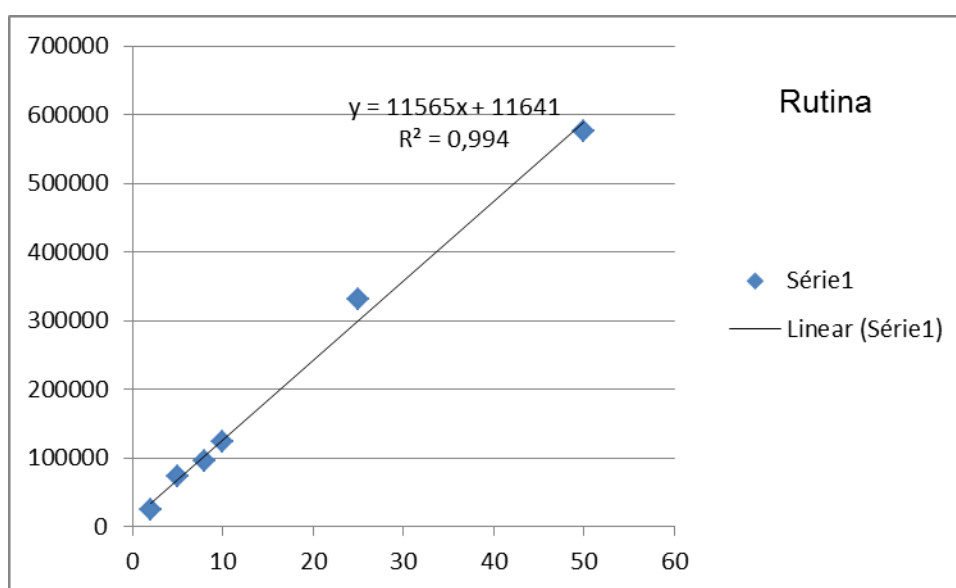
**Figura 26:** Curva de calibração do flavonoide apigenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 1



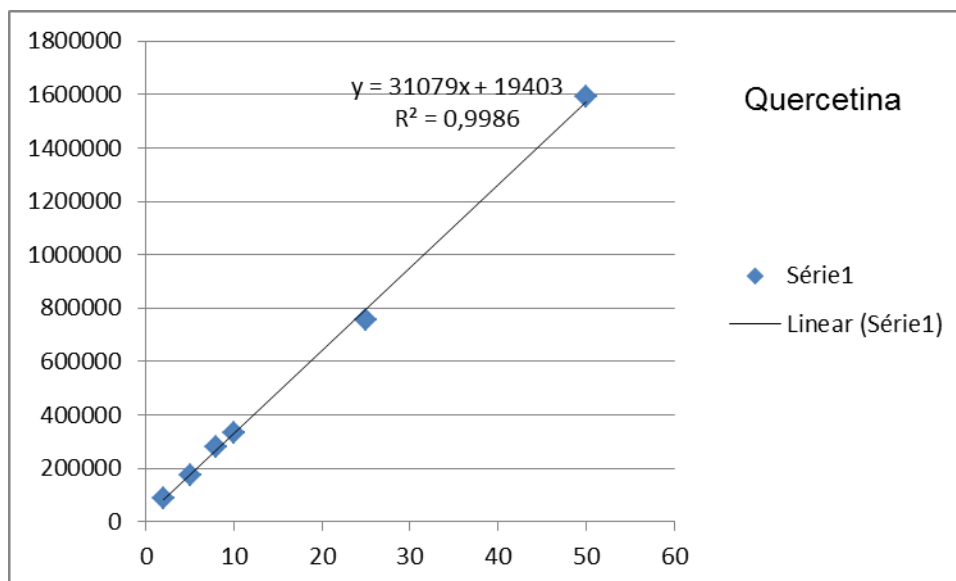
**Figura 27:** Curva de calibração do ácido cafeico ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 2



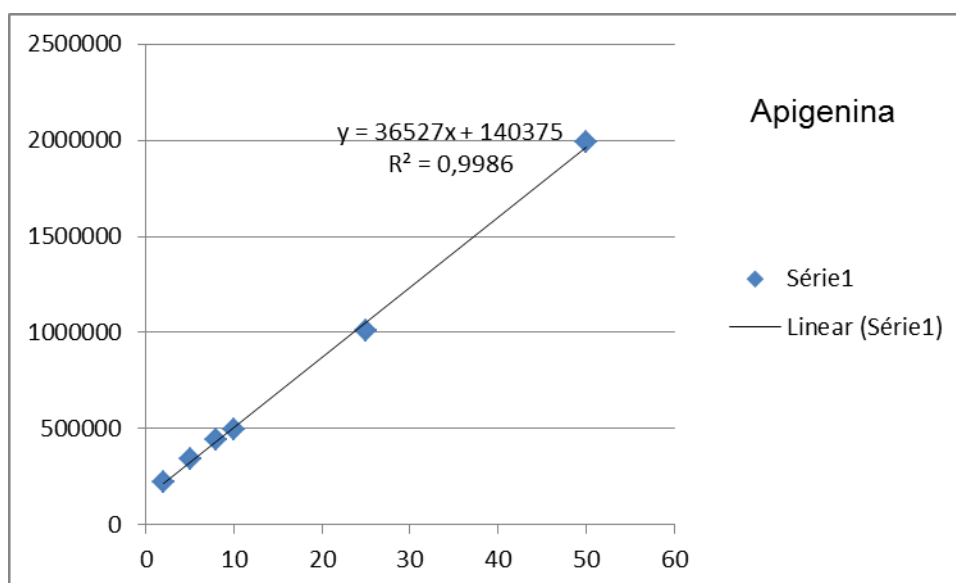
**Figura 28:** Curva de calibração do ácido clorogênico (µg/mL) no gradiente 2



**Figura 29:** Curva de calibração do flavonoide rutina (µg/mL) no gradiente 2



**Figura 30:** Curva de calibração do flavonoide quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 2



**Figura 31:** Curva de calibração do flavonoide apigenina ( $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente 2

Para identificação e quantificação dos compostos nas amostras, foram feitas comparações dos tempos de retenção encontrados nas amostras com os tempos de retenção dos padrões comerciais puros, após esta análise preliminar, foram feitas co-injeções das amostras adicionadas de padrões puros e analisados

novamente seus tempos de retenção. Para uma comprovação mais eficiente também foram feitas comparações entre os espectros de Ultravioleta das substâncias encontradas nas amostras com os espectros dos padrões comerciais.

Após todas as injeções, os dados foram recolhidos, tratados e submetidos às análises estatísticas utilizando o programa estatístico SAEG, versão 9.1 de 2006, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa.

#### **4.4- Atividade Antioxidante.**

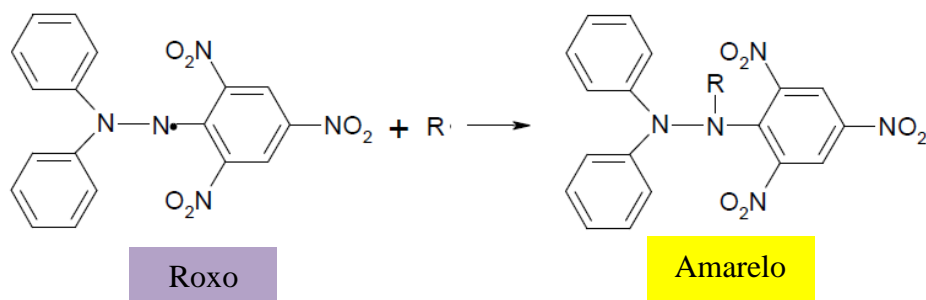
##### **4.4.1- Método DPPH**

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).

Este método se baseia no sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos antioxidantes, que produzem uma diminuição de absorção em 515 nm, mudando a coloração da substância de roxo para amarelo (Brand-Williams et al., 1995).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm (Prado, 2009).

Quando em contato com um doador de hidrogênio ou elétron, o radical DPPH é reduzido, portanto a intensidade de absorção diminui e a solução contendo o radical perde cor, tornando-se amarela (Figura 32), de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, a mudança de cor acontece quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes (Prado, 2009).



**Figura 32:** Mudança de coloração do DPPH devido à sua estabilização.  
Fonte: Rufino et. al., (2007).

A técnica consiste em adicionar 1 mL do extrato etanólico, em concentrações que variam de 10 - 1000 µg/mL. A este foi adicionado 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), a reação se processou em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada em 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (os experimentos foram realizados em três repetições).

A atividade sequestradora de radicais livres do extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT) (Koleva et al., 2002; Tait et al., 1996).

A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e calculada conforme fórmula abaixo (Yen e Duh, 1994):

$$\% \text{ Inibição} = [ (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}}) / A_{\text{DPPH}} ] \times 100$$

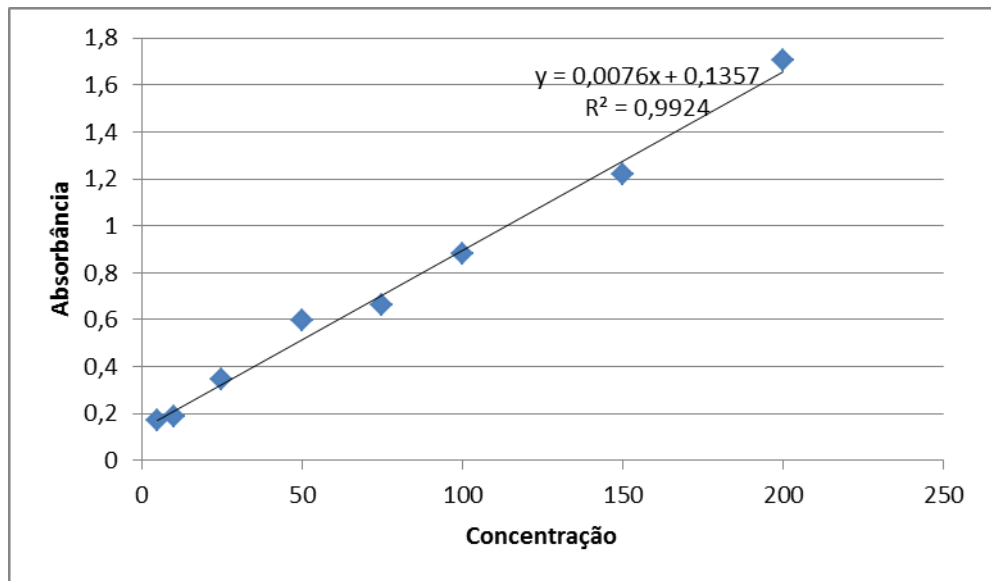
Onde  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorbância da solução de DPPH e  $A_{\text{Extr}}$  é a absorbância da amostra em solução.

#### 4.5- Análise dosagem de fenóis totais dos extratos:

O conteúdo fenólico total foi quantificado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, que por sua vez tem sido um método amplamente utilizado para dosagem de fenóis totais que envolvem a redução dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos fenólicos presentes na amostra a óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ) em meio alcalino formando um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por Swain e Hillis em 1959.

Para o preparo das amostras, foi pesado 1 mg de cada acesso e solubilizado com 1 mL de metanol. Foram retirados 30  $\mu$ L dessas soluções e transferidos para placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 50  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N) e acrescentados 100  $\mu$ L de carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) 7,5% após 10 min. A leitura da absorvância foi realizada a 760 nm após 2 h de incubação à temperatura ambiente.

Para quantificação de fenóis totais foi construída uma curva padrão com solução de ácido gálico, em concentrações que variavam de 5,0 a 200  $\mu$ g/ $\mu$ L. A partir da reta obtida, realizou-se os cálculos dos conteúdos de fenólicos totais, expressos em mg de ácido gálico /g da amostra (Figura 33). O experimento foi realizado em triplicata. Através de uma curva de calibração de ácido gálico foi possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo os dados analisados pelo programa estatístico SAEG, versão 9.1 de 2006, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) (Zimmer et al; 2012).



**Figura 33-** Curva de calibração do ácido gálico (µg/mL)



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Atividade Antioxidante

O processo de oxidação de lipídios caracteriza-se como uma das principais causas da deterioração de alimentos, comprometendo a qualidade e a segurança destes produtos. Portanto, alimentos ricos em lipídios têm sido alvo de preocupação por parte das indústrias alimentícias que buscam novos meios para preservá-los de tais processos deteriorativos. Entre as várias estratégias empregadas para controlar a oxidação dos lipídios, a adição de antioxidantes é a abordagem mais eficaz, conveniente e econômica (Zhong e Shahidi, 2012).

Estruturalmente, os antioxidantes são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos, como o BHT e o BHA (Figura 1, pág. 10), ou naturais, como os compostos fenólicos que fazem parte da constituição de diversos alimentos (Ramalho e Jorge, 2006).

Há um grande interesse em substituir os antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos por antioxidantes naturais, visto que, tem-se questionado a utilização dos antioxidantes sintéticos, que segundo estudos podem apresentar toxidez (Souza, 2006).

Desta forma, verifica-se que nos últimos anos tem aumentado a procura por compostos que apresentam este potencial a partir de fontes naturais, como vegetais, frutas, especiarias, etc. (Silva et al, 2013).

As Pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente utilizadas em todo o mundo e têm sido consideradas como excelentes fontes de substâncias com potencial antioxidante como as vitaminas C, E, pró-vitamina A, os carotenoides e os compostos fenólicos (Sun et al, 2007; Materská e Perucka, 2005).

Os métodos utilizados na literatura para se determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas são diversos. Porém, para a determinação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos obtidos dos diferentes acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* foi adotado o método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), por ser um dos métodos mais utilizados, devido a sua rapidez, facilidade, estabilidade e por ser um radical livre estável disponível comercialmente (Sucupira et al, 2012; Lima, 2008).

As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH (radical livre) e convertem-no em 2,2-difenil-1-picril hidrazina, mudando assim a coloração da substância, indicando o potencial antioxidante do extrato.

Os extratos foram avaliados em concentrações de 1000, 100 e 10 µg/ml e os resultados podem ser observados na Tabela 6. O potencial da atividade antioxidante de cada acesso também foi expresso através do EC<sub>50</sub>, o qual é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, ou seja, quanto menor o valor de EC<sub>50</sub>, maior o potencial antioxidante.

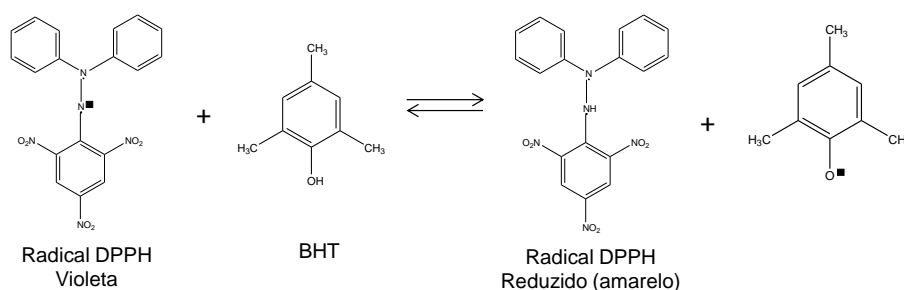
**Tabela 6:** Atividade Antioxidante pelo método DPPH dos extratos etanólicos de cada acesso de *Capsicum baccatum* e do padrão comercial fenólico 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT)

Amostras	Concentrações		
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	EC <sub>50</sub>
BRS	100	40	3,34 ± 1,21
1417	86	23	162,8 ± 1,15
1490	100	9	3,34 ± 1,61
1492	58	16	734,1 ± 1,06
1494	24	15	3225 ± 1,31
1495	100	19	3,34 ± 1,45
1500	56	11	775,1 ± 1,02
1573	72	17	395,3 ± 1,04
1584	81	13	265,8 ± 1,2
1611	100	13	3,34 ± 1,54
1613	100	64	3,34 ± 1,1
1616	86	64	167,3 ± 1,18
1628	71	53	382,5 ± 1,36
1629	100	44	3,34 ± 1,18
1630	100	65	3,34 ± 1,09
1633	100	53	3,34 ± 1,13
1637	83	62	176,5 ± 1,18
1639	100	48	3,34 ± 1,16
1642	100	41	3,34 ± 1,13
1643a	100	48	3,34 ± 1,17
1643b	89	5	119,4 ± 1,48
1704	44	6	1290 ± 1,04
1714	78	11	282,1 ± 1,22
1718	52	7	935,5 ± 1,05
1732	100	28	3,34 ± 1,31
1733	69	34	449,3 ± 1,23
1737	70	0	421,8 ± 1,31
1738	100	18	3,34 ± 1,46
1797	100	0	3,34 ± 1,77
<b>Padrão fenólico: 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT)</b>			
BHT	100	52	40,35 ± 1,51

Obs: os acessos marcados com a cor azul são os mais ativos. Média ± Desvio Padrão.

Vale ressaltar que o teste foi realizado em três repetições e os resultados apresentados se referem às médias aritméticas.

O padrão comercial de estrutura fenólica, BHT (Butil-hidroxi-tolueno) foi escolhido por ser um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos, sendo assim, considerável comparar seu potencial antioxidante com os dos acessos investigados neste trabalho. A figura 34 mostra como o BHT se comporta frente ao radical livre DPPH, sendo capaz de doar um átomo de hidrogênio, estabilizando assim este radical.



**Figura 34:** Reação entre o antioxidante sintético BHT e o radical livre DPPH. Fonte: Adaptado (Oliveira et al., 2009).

Observa-se que na maior concentração testada (1000 µg/mL) todos os acessos apresentaram atividade, sendo que 14 dos 29 acessos (Tabela 6), além do genótipo testemunha BRS-Mari, apresentaram atividade máxima (100%), podendo ser comparados ao potencial antioxidante do BHT, nesta mesma concentração e considerados os de melhor desempenho frente a este radical. Os demais acessos apresentaram entre 44 e 89% de atividade.

Para a concentração de 100 µg/mL, verificou-se percentuais intermediários de radicais livres DPPH sequestrados, entre 0 e 65%. Sendo os acessos 1613, 1616, 1628, 1630, 1633 e 1637, os mais expressivos nesta concentração, apresentando entre 53 e 64% de atividade, podendo inclusive serem comparados ao BHT, visto que seu potencial antioxidante se encontra na faixa de 52%. Desta forma, os acessos 1613, 1616, 1630 e 1637, quando avaliados na concentração de 100 µg/mL, apresentam potencial antioxidante superior ao BHT, mas já os acessos 1737 e 1797 não apresentaram atividade nesta mesma concentração e,

todos os outros que apresentaram atividade inferior a 50% não foram considerados com bons sequestradores de radicais livres.

Os extratos dos acessos também foram testados frente ao DPPH na concentração de 10 µg/mL, no entanto, nenhum dos 29 acessos, incluindo o genótipo testemunha (BRS-Mari) apresentou atividade nesta concentração.

Em uma análise meramente qualitativa, os acessos com 100% de atividade na concentração de 1000 µg/mL, podem ser considerados de maior desempenho na inibição dos processos de oxidações lipídicas, quando se busca uma ação mais efetiva, sendo os acessos 1613, 1616, 1630 e 1637, de ação intermediária na concentração de 100 µg/mL.

Estes resultados corroboram com os de outros pesquisadores que também verificaram altos potenciais antioxidantes para pimentas desta mesma espécie.

Silva et al. (2009), ao analisar o potencial antioxidante do extrato filtrado de *Capsicum baccatum*, também por meio do método DPPH, verificaram que quanto maior a concentração dos extratos desta pimenta na solução de DPPH, mais rápida e mais eficiente ocorreu a diminuição da absorvância, conseqüentemente maior potencial antioxidante foi notado. Fato este que também se pode observar no presente trabalho, visto que os maiores percentuais de captura do radical DPPH foram verificados na maior concentração testada (1000 µg/mL).

Ainda no trabalho de Silva et al. (2009), em uma comparação do potencial antioxidante de pimentas desta mesma espécie, com a ação antioxidante do ácido ascórbico, pôde ser observado que 0,5 g de extrato de *C. baccatum* equivalem na sua ação antioxidante a 1,0 g de ácido ascórbico.

Na pesquisa de Costa et al. (2009), também foi comparado o potencial antioxidante dos extratos de pimentas *C. baccatum* em relação ao potencial antioxidante do padrão fenólico BHT, encontrando-se cerca de 82% de atividade para estes extratos, sendo considerados de maior potencial antioxidante em relação ao BHT. Costa et al. (2009) também constataram a eficiência do método DPPH frente aos extratos de *C. baccatum* e foi possível verificar que os extratos polares foram os mais eficientes em relação a este método. Fato este que corrobora com a forma de extração adotada para este trabalho de mestrado.

É importante ressaltar que diferenças encontradas no potencial antioxidante destas mesmas espécies em relação aos resultados verificados por outros pesquisadores podem estar relacionadas a diversos fatores que afetam

diretamente no teor de metabólitos secundários produzidos, visto que estudos anteriores relataram a influência de algumas variáveis importantes como condições climáticas, época do ano do plantio, sazonalidade, forma de extração, tipo de solvente escolhido, etc., no teor de metabólitos secundários destas plantas (Tsakona et al., 2012; Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Além destes fatores pode-se justificar a própria discrepância de valores de atividade antioxidante entre os acessos investigados, tendo em vista que são todos da mesma espécie vegetal, pelo fato da heterogeneidade existente nesta espécie, de forma que morfológicamente os frutos se apresentem de tamanhos, cores e formatos diferentes como pode ser verificado no estudo de Wahyuni et al. (2011), assim espera-se que também haja essa diversificação nos constituintes químicos presentes nestes frutos.

Ainda neste contexto de heterogeneidade da espécie estudada, Wahyuni et al. (2011) também relatam diferença no teor de flavonoides e vitaminas entre 32 acessos deste mesmo gênero, reafirmando o que está sendo proposto de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Apesar das pimentas do gênero *Capsicum* serem conhecidas e difundidas em todo o mundo, ainda são escassos os trabalhos que investiguem a fundo o potencial antioxidante, bem como o conteúdo de fenólicos presentes em frutos das espécies deste gênero. E até mesmo, há poucos relatos na literatura sobre quais compostos conferem seus expressivos valores de atividade antioxidante. Portanto, ressalta-se a importância deste estudo em investigar o potencial antioxidante e o teor de fenóis totais dos frutos da espécie *C. baccatum*, além de quantificar alguns dos compostos fenólicos mais comumente identificados nesta espécie, para desta forma tentar relacionar o teor de fenóis ao potencial antioxidante observado.

## **5.2. Teor de Fenóis Totais**

Os compostos fenólicos são importantes constituintes de várias frutas e hortaliças, desta forma considera-se importante a quantificação dessas substâncias, pois revela informações a respeito da atividade antioxidante, da qualidade destes alimentos e conseqüentemente dos potenciais benefícios à

saúde humana (Talcott et al., 2003). Nos últimos anos estes compostos têm sido alvo de inúmeras pesquisas, por diversos fatores, mas, sobretudo por inibirem processos de peroxidação lipídica aumentando assim o tempo de vida útil de alimentos gordurosos.

A atividade antioxidante destes compostos deve-se principalmente à capacidade de doar átomos de hidrogênio, estabilizando radicais livres, devido à estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Chun et al., 2005; Soares, 2002; Haslam, 1996).

No presente trabalho de mestrado, a quantificação do teor de fenóis totais nos diferentes acessos de *C. baccatum* foi realizada utilizando o reagente de Folin Ciocalteu que está entre as técnicas mais utilizadas para tal finalidade.

Este reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstídico, em que o molibdênio e o tungstênio são oxidados em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e o tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Naczek e Shahidi, 2004; Ikawa et al., 2003).

Na tabela 7, pode-se verificar os resultados da análise de variância e o resultado de teste F e na tabela 8, constam os resultados da concentração de fenóis totais de cada acesso, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato de acordo com teste de Scott Knott.

**Tabela 7:** Teste de Análise de Variância para Fenóis Totais e Resultados de Teste F

	<i>GL</i>		<i>F</i>
Tratamento	28	121686,9000	9533,98(*)
Resíduo	58	12,7635	
Total	86		

(\*) Significante em nível de 5% probabilidade.

**Tabela 8:** Resultados do Teor de Fenóis Totais dos acessos de *C. bacatum*

<b>Acesso</b>	<b>Concentração (mg EAG/g ext.)</b>	<b>Comparação (5%)</b>
BRS	985,3333	A
1643b	630,3223	B
1611	438,5837	C
1417	409,4000	D
1494	296,9884	E
1613	274,3558	F
1584	252,3896	G
1643 <sup>a</sup>	249,1881	G
1490	241,8907	H
1630	225,2456	I
1573	212,5607	J
1624	204,1881	K
1633	195,4033	L
1629	190,5500	L
1738	175,1033	M
1616	154,3281	N
1492	151,8761	N
1495	146,6986	O
1704	144,6468	O
1642	127,6728	P
1500	119,8979	Q
1639	89,6535	R
1733	87,4718	R
1637	83,6193	R
1797	40,1284	S
1737	33,0609	T
1718	28,6926	T
1714	12,2974	U
1628	7,4518	U

Teste de Scott Knott. Obs: o acesso marcado com a cor azul foi o que apresentou maior teor fenólico.



Analisando a variável aleatória fenóis totais, utilizando o teste de Scott Knott, em razão da significância dos acessos na análise de variância, em nível de 5% de probabilidade, foram obtidos 21 (vinte e um) grupos estatisticamente iguais.

Verifica-se que o grupo "A" foi constituído apenas do genótipo testemunha BRS-Mari, sendo este o acesso que apresentou maior teor de fenóis totais (985,33 mg EAG/g). O segundo grupo foi constituído apenas do acesso 1643b, apresentando 64,27% do teor de fenóis do genótipo testemunha.

Como se pode observar o acesso BRS apresentou 100% de atividade antioxidante na concentração de 1000 µg/ml e conseqüentemente foi o acesso que apresentou o maior teor de fenóis totais, portanto há uma forte evidência da associação entre a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais. Visto que não se pode afirmar tal relação para todos os acessos, porque ao se observar o acesso 1494 (grupo E), por exemplo, verifica-se que apresentou teor considerável de fenóis (296,9884 mg EAG/g), porém seu potencial antioxidante em 1000 µg/ml foi de apenas 44%.

Da mesma forma ocorreu com o acesso 1628 (grupo U), que obteve o menor teor fenólico de todos os acessos, no entanto, apresentou valor de atividade antioxidante significativo (71%) em 1000 µg/ml.

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os resultados encontrados por outros pesquisadores, levando-se em consideração as variabilidades encontradas em espécies deste gênero (*Capsicum*) e o número de acessos avaliados.

No entanto, alguns acessos apresentaram teores mais elevados do que os encontrados por outros pesquisadores, e outros apresentaram teores inferiores de fenóis totais, o que mostra que outras moléculas podem estar agindo de forma sinérgica conferindo potencial antioxidante a estes extratos dos acessos avaliados.

No estudo de Zimmer et al. (2012), por exemplo, para os extratos etanólicos de *C. baccatum* foi encontrado  $180,08 \pm 3,7$  mg EAG/g de extrato de fenóis totais, sendo este valor inferior ao encontrado para o acesso BRS (985,3333 mg EAG/g), mas corrobora com os valores de fenóis encontrados nos acessos 1633, 1629 e 1738 (entre 195,40 e 175,10 mg EAG/g).

Kappel (2008), ao analisar o teor de compostos fenólicos de frutos de *C. baccatum* em diferentes estágios de maturação, encontrou para os frutos maduros

valores de fenóis entre 7688,1 mg EAG/100 g de extrato. Sendo este valor condizente com os valores obtidos nos acessos 1500, 1733 e 1637.

Melo et al., (2011) avaliaram o teor de compostos fenólicos nas pimentas *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. frutescens*. As concentrações expressas em ácido gálico foram respectivamente: 29400 mg EAG/100 g, 34712 mg EAG/100 g e 1328,28 mg EAG/100 g. Sendo estes valores também encontrados nos acessos 1494,1417 e 1714.

Alvarez-Parrilla et al. (2011) avaliaram os teores de fenóis totais em pimentas *C. annum* e verificaram teores de fenóis na faixa de 568 mg EAG/100 g. Valores estes que coincidiram com o trabalho realizado por Chuah et al. (2008) e Deepa et al. (2007), que também encontraram teores de fenóis totais variando na faixa de 400 a 1200 mg EAG/100 g de extrato de pimentas do gênero *Capsicum*.

É importante ressaltar que as concentrações de compostos fenólicos variam de acordo com a espécie, a variedade, do meio ambiente, do estado fisiológico, de condições climáticas e também de acordo com o estágio de maturação em que os frutos foram colhidos.

Conforti et al., (2007), ao compararem os níveis de fenóis totais em frutos de pimentas do gênero *Capsicum* de acordo com o estágio de maturação, verificaram em suas análises que o teor de fenóis diminui com o aumento da maturidade. Portanto, diferenças como estas também podem ser notadas no potencial antioxidante destes frutos.

Alguns pesquisadores encontram correlação entre a variável fenóis totais e a atividade antioxidante, mas muitos outros não encontraram tal relação (Melo et al., 2008; Souza et al., 2007; Conforti et al., 2006).

O fato de não se encontrar uma correlação entre o teor de fenóis totais e a capacidade sequestradora de radicais livres, pode ser explicado por diversos fatores. Visto que, na realidade o conteúdo de fenóis totais não é unicamente o responsável por todo potencial antioxidante de uma amostra em estudo. Além disso, deve-se considerar o sinergismo presente entre a mistura destes compostos antioxidantes que faz com que a atividade antioxidante não só dependa da concentração dos compostos que a confere, mas também sobre a estrutura e a interação entre estas substâncias (Conforti et al., 2007).

Além disso, o método escolhido para a quantificação de fenóis totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu, além de ser o mais amplamente utilizado, pode

superestimar os reais valores de compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas, pois como este método se baseia na oxidação do reagente de Folin-Ciocalteu, qualquer outra substância não fenólica, mas que seja capaz de oxidá-lo será tida como fenólica (Deepa et al., 2007).

### **5.3. Quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides por CLAE**

#### **5.3.1- Gradiente 1**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) está entre as técnicas mais utilizadas para identificação e quantificação de compostos fenólicos, por ser uma técnica rápida e de alta resolução (Dutra e Ribani, 2009).

As eluições podem ser do tipo gradiente ou isocrático, sendo a fase móvel geralmente constituída de água e solventes orgânicos, além de também poder ser incluído, pequenas concentrações de soluções ácidas, para que desta forma, possam impedir a ionização de grupos acídicos (grupos que possuem hidrogênios ionizáveis) presentes nas amostras, além de melhorar a resolução dos picos (Valentão, 2002; Ferreres et al., 1889).

No presente trabalho, os extratos etanólicos foram quantificados quanto ao teor de ácidos fenólicos e flavonoides (Tabela 5, pág. 41) em dois diferentes gradientes de eluição (Tabela 4, pág. 40), em que no gradiente 1 trabalhou-se com água ultrapura acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) na bomba A e Acetonitrila na bomba B, conforme foi detalhado na seção de materiais e métodos (pág. 31).

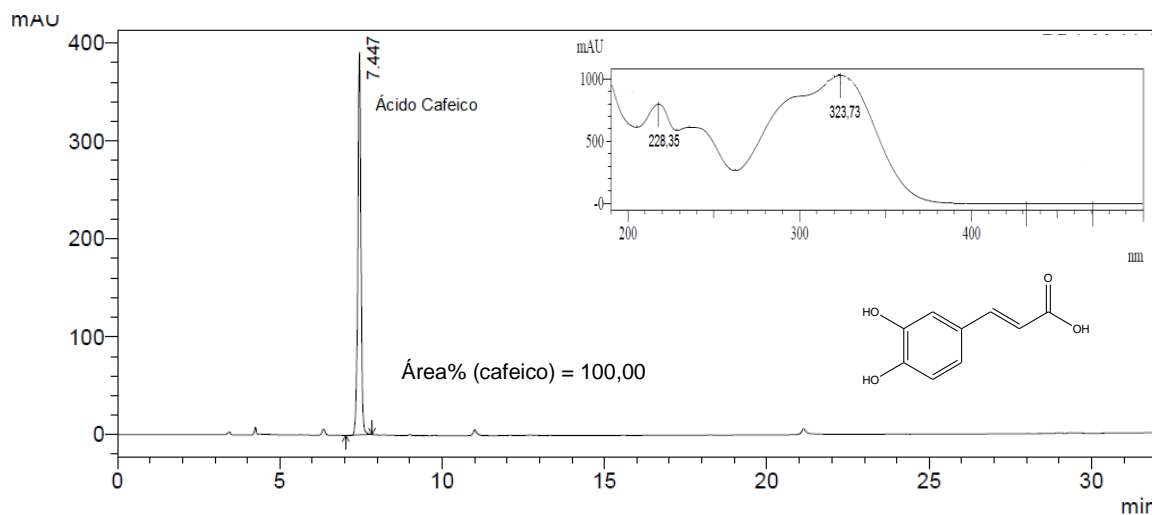
Para a quantificação dos compostos fenólicos foram feitas curvas de calibração (pág. 42) de cada padrão fenólico escolhido de acordo com sua presença na espécie *C. baccatum*, para que os tempos de retenção e os espectros de UV dos mesmos pudessem ser comparados aos compostos identificados nas amostras.

A Tabela 9 mostra um resumo dos dados obtidos a partir da CLAE para os padrões fenólicos, como os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda dos ácidos fenólicos e flavonoides, além de seus respectivos percentuais

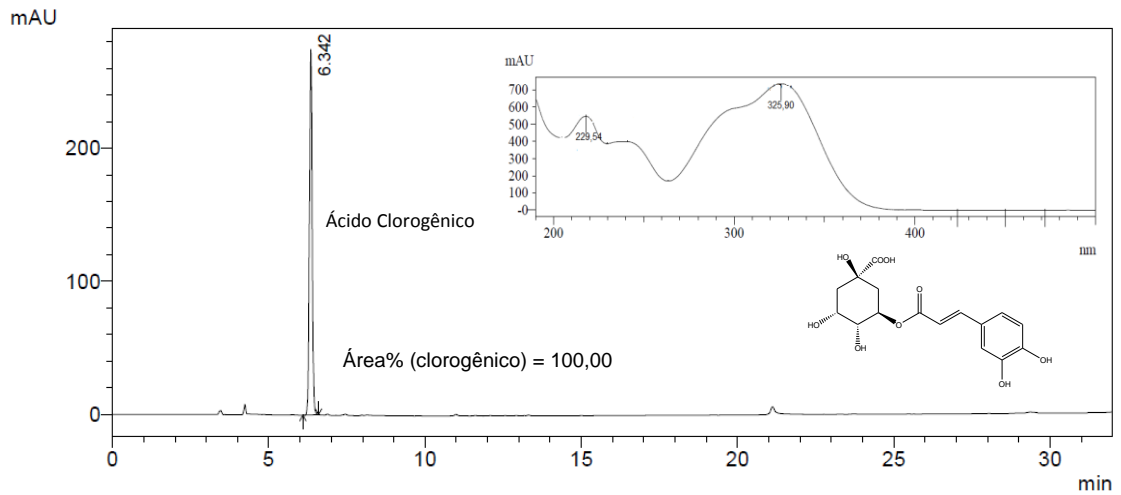
de área que mostram o grau de pureza destes padrões. Estes dados foram reunidos (tabela 9), para facilitar a comparação a partir dos dados observados para as amostras oriundas dos acessos de *C. baccatum*. Os cromatogramas e os espectros de absorção no UV correspondentes às análises dos padrões de ácidos fenólicos e dos flavonoides estão nas Figuras 35-39 (pág. 62-64).

**Tabela 9:** Tempos de retenção ( $T_R$ ), comprimentos de onda ( $\lambda$  max) e percentual de área (Área %) dos padrões fenólicos analisados por CLAE.

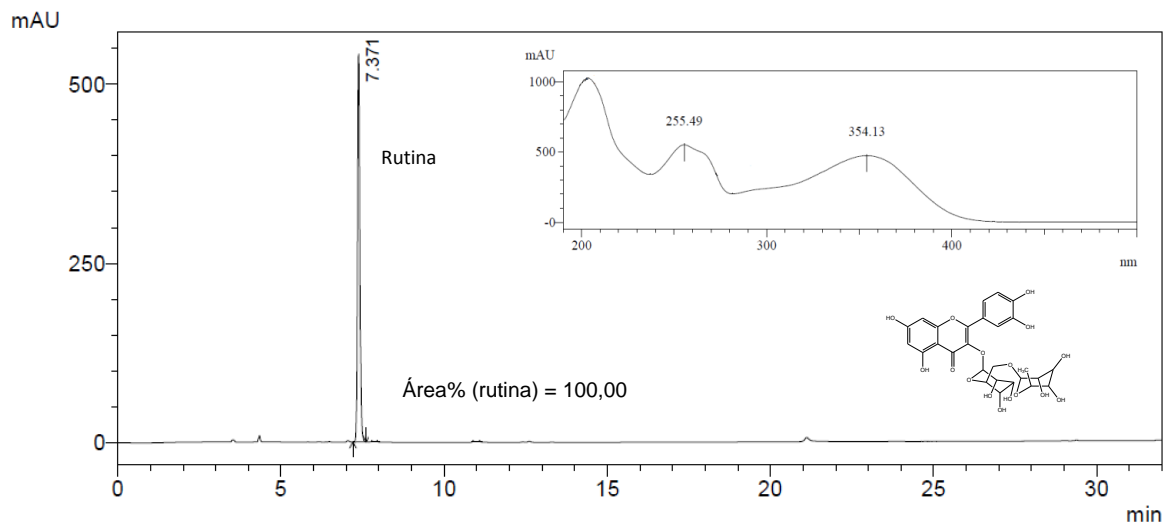
<i>Padões</i>	$T_R$ (minutos)	$\lambda$ max (nm)	Área %
Ácido Cafeico	7,447	323,73	100
Ácido Clorogênico	6,342	325,90	100
Rutina	7,371	255,49; 354,13	100
Quercetina	10,987	254,96; 368,84	100
Apigenina	12,092	267,18; 335,97	100



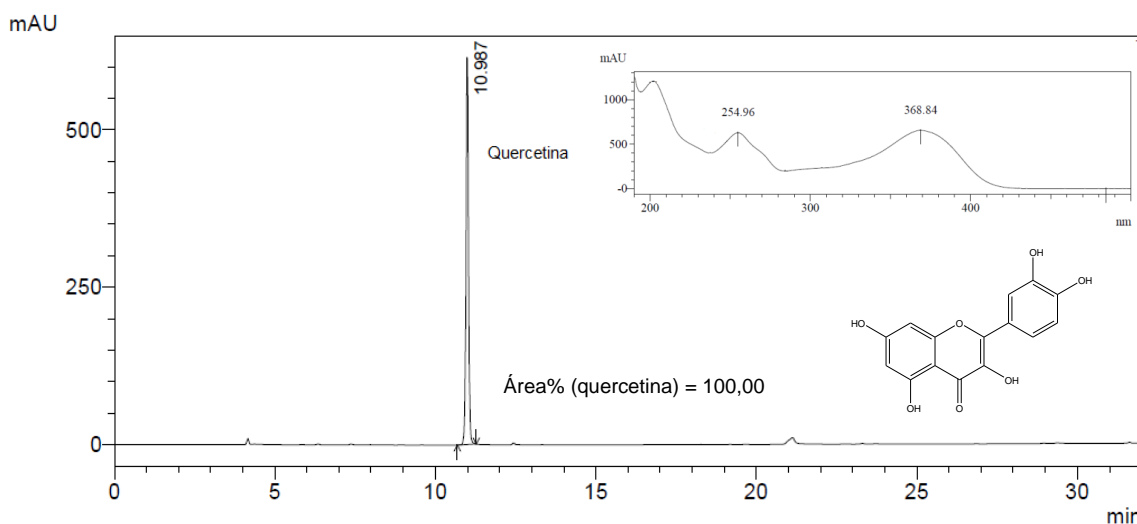
**Figura 35:** Cromatograma do padrão puro de Ácido Cafeico (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.



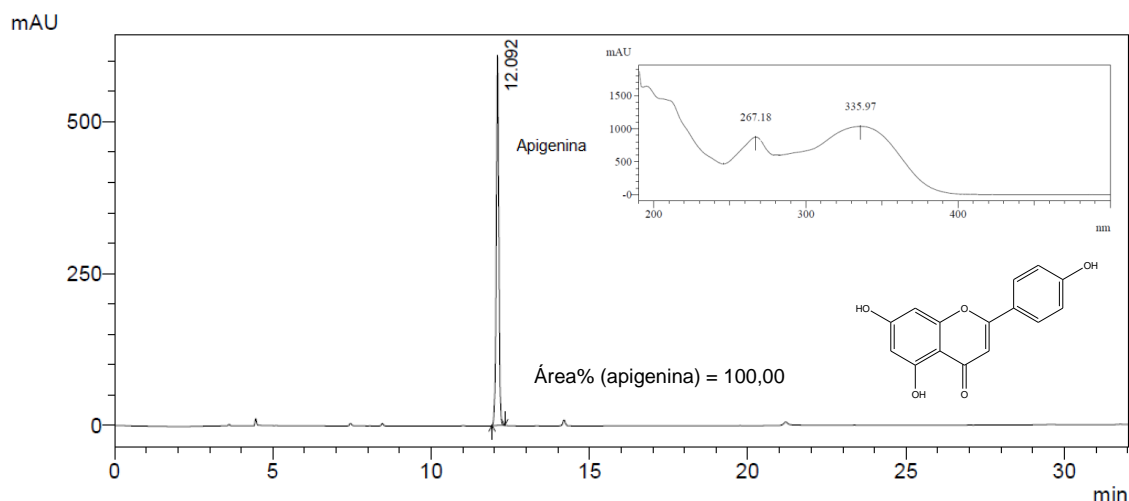
**Figura 36:** Cromatograma do padrão puro de Ácido Clorogênico (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.



**Figura 37:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide Rutina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.



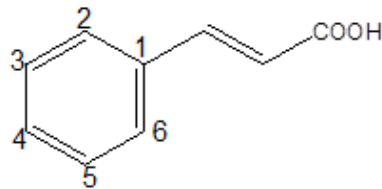
**Figura 38:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide Quercetina (50 µg/mL) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.



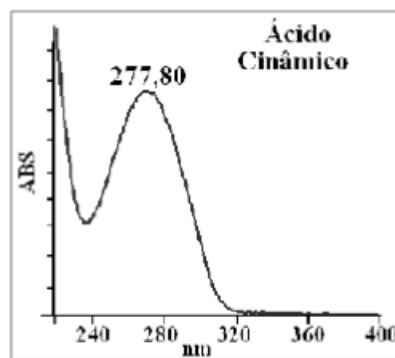
**Figura 39:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide Apigenina (50 µg/mL) no gradiente de eluição 1 e seu respectivo espectro de UV.

Os compostos fenólicos possuem núcleos aromáticos muitas vezes conjugados, portanto, apresentam espectros de UV característicos, com um ou mais picos de absorção entre 230 a 340 nm, que por sua vez, ao sofrerem ionização provocada por algum composto básico, estes podem sofrer desvio batocrômico entre 15 e 50 nm, acompanhado de aumento de absorbância (Harbone, 1889).

O ácido clorogênico e o ácido cafeico, por sua vez, são derivados do ácido cinâmico (Figura 40), que possui espectro de UV, com absorção máxima em torno de 280 nm, como consta na figura 41.

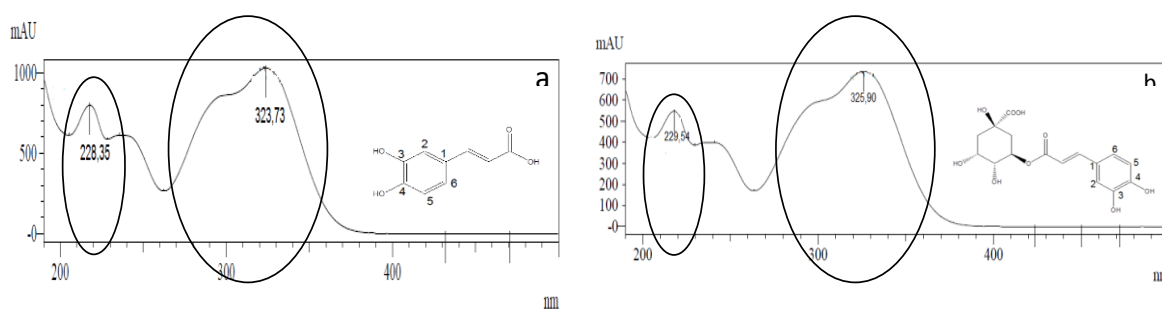


**Figura 40:** Estrutura do ácido cinâmico.



**Figura 41:** Espectro de UV do ácido cinâmico. Fonte: Lianda, 2010

Para os espectros de UV dos ácidos clorogênico (a) e cafeico (b), se observa um primeiro máximo entre 225 e 235 nm e dois outros entre 290 e 330 nm, como pode ser observado, na figura 42. Estas últimas aparecem devido ao isomerismo *cis* e *trans* e suas absorbâncias relativas estão de acordo com a proporção de cada isômero (Valentão, 2002; Harbone, 1989; Riberéau-Gayon, 1968).

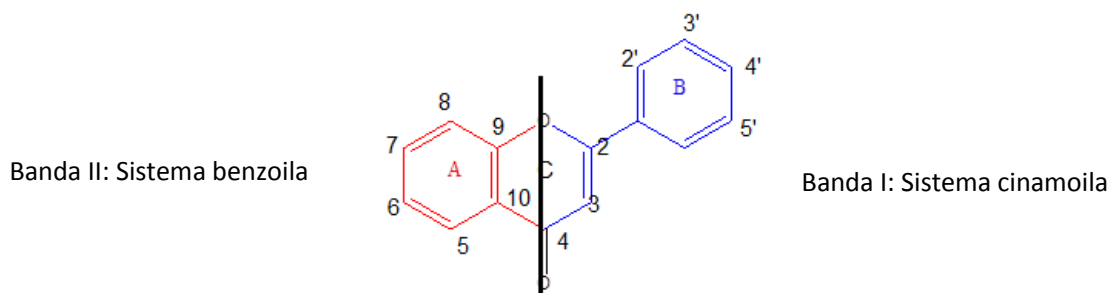


**Figura 42:** Bandas de absorção no espectro de UV dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico. (a) espectro de UV do ácido cafeico. (b) espectro de absorção do ácido clorogênico.

Estes ácidos são derivados do ácido cinâmico, e se pode observar um desvio batocrômico em relação ao ácido cinâmico ( $\lambda = 277,80$  nm), devido a estes apresentarem substituintes nas posições 3 e 4 do anel aromático (Figura 40), independentes de serem hidroxilas e/ou metoxilas (Lianda, 2009). Fato este que pôde ser observado nos espectros de UV do ácido cafeico ( $\lambda = 323,73$  nm) e do ácido clorogênico ( $\lambda = 325,90$ ) (Figura 42).

Já para os flavonoides, seus espectros no ultravioleta podem ser determinados em etanol ou metanol e estes podem apresentar duas bandas de absorção máxima, uma entre 240 e 285 nm (banda II, devido à absorção do anel A, sistema benzoila) e outra entre 300 e 450 nm (banda I, devido ao anel B, sistema cinamoila), como mostra a figura 43 (Simões et al., 2000; Harbone, 1994). A intensidade e posição específica de cada um destes comprimentos de onda ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) podem fornecer informações importantes para identificação do tipo de flavonoide e a posição da oxigenação, visto que, o espectro é afetado principalmente pelo tipo de oxigenação, ou seja, um aumento da oxigenação pode provocar um desvio batocrômico (desvio para maiores comprimentos de onda) (Markham, 1989; Mabry et al., 1970).





**Figura 43:** Bandas de absorção no UV dos flavonoides. Fonte: Adaptado de Lianda, 2009.

Nos espectros de UV obtidos para os padrões puros dos flavonoides quercetina (flavonol), rutina (flavonol) e apigenina (flavona) (Figuras 36-38, pág. 63-64), verificou-se a presença destas duas bandas características de flavonoides.

Segundo Lianda (2009), quando os grupos hidroxilas nas posições C3, C5 ou C4' dos núcleos das flavonas ou flavonóis são metilados ou glicosilados, ocorrem desvios hipsocrômicos, principalmente na banda de maior comprimento de onda (banda I), fato este que pode ser observado, principalmente, no espectro de UV da rutina ( $\lambda = 354,13$  nm) (Figura 35), comparado ao espectro de UV da quercetina ( $\lambda = 368,84$  nm) (Figura 36), em que apresenta um efeito hipsocrômico de aproximadamente 20 nm, devido à presença do açúcar na posição 3 da aglicona.

Desta forma, a partir das análises dos espectros de UV dos padrões, juntamente com os tempos de retenção e as coinjeções destes padrões puros em CLAE, foi possível identificar e quantificar os ácidos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos dos diferentes acessos das pimentas *C. baccatum*.

Nas tabelas a seguir (Tabelas 10-13), constam os valores obtidos de acordo com o teste de Scott Knott, a partir da quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides em cada acesso analisado neste gradiente, e vale ressaltar, que as análises foram realizadas em três repetições, sendo expressos aqui os valores médios para cada substância quantificada.

O experimento foi realizado segundo delineamento em blocos casualizados a fim de se comparar os 29 acessos dentro de cada gradiente de eluição.

**Tabela 10:** Resultados da quantificação do ácido clorogênico no gradiente 1

<b>Acessos</b>	<b>Concentração de Ácido Clorogênico (mg/g)</b>	<b>Comparações</b>
1417	1,5423	A
1642	0,9574	B
1584	0,9573	B
1494	0,8249	B
1714	0,6887	C
1737	0,6319	C
1611	0,6251	C
1738	0,5759	C
1500	0,5012	D
1492	0,4895	D
1733	0,4435	D
1490	0,3924	E
1637	0,3526	E
1573	0,3472	E
1643b	0,3442	E
1613	0,2972	E
1639	0,2944	E
1616	0,2879	E
1704	0,2866	E
1643a	0,2712	E
1629	0,2576	E
1630	0,2235	E
1732	0,1904	E
BRS	0,1706	E
1628	0,0425	E

Teste de Scott Knott. Obs: o acesso marcado com a cor azul foi o que apresentou maior teor de ácido clorogênico (Grupo A).

**Tabela 11:** Resultados da quantificação do ácido cafeico do gradiente 1

<b>Acessos</b>	<b>Concentração de Ácido Cafeico (mg/g)</b>	<b>Comparações</b>
1490	0,7422	A
1492	0,6495	A
1417	0,6131	A
1643b	0,5296	B
1629	0,4337	B
1639	0,1954	C
1704	0,0632	C

Teste de Scott Knott. Obs: o acesso marcado com a cor azul foi o que apresentou maior teor de ácido cafeico (Grupo A).

**Tabela 12:** Resultados da quantificação do flavonoide quercetina no gradiente 1

<b>Acesso</b>	<b>Concentração Quercetina (mg/g)</b>	<b>Comparações</b>
1494	0,3426	A
1495	0,2524	B
1492	0,1722	C
1584	0,0737	D
1628	0,0290	D
1611	0,0201	D

Teste de Scott Knott. Obs: o acesso marcado com a cor azul foi o que apresentou maior teor de quercetina (Grupo A)

**Tabela 13:** Resultados da quantificação do flavonoide rutina no gradiente 1

<b>Acessos</b>	<b>Concentração Rutina (mg/g)</b>	<b>Comparações</b>
1714	0,8168	A
1417	0,7373	A
1492	0,4469	B
1733	0,4010	B
1584	0,3968	B
1643 <sup>a</sup>	0,3658	B
BRS	0,2703	C
1643b	0,2480	C
1573	0,1984	D
1613	0,1770	D
1628	0,1678	D
1630	0,0798	E
1495	0,0291	E
1616	0,0285	E
1738	0,0261	E

Teste de Scott Knott. Obs: o acesso marcado com a cor azul foi o que apresentou maior teor.de rutina (Grupo A)

Analisando os teores de ácidos fenólicos e flavonoides quantificados por CLAE, utilizando o teste de Scott Knott, em razão da significância dos acessos em nível de 5% de probabilidade, foram obtidos grupos estatisticamente iguais. Sendo o grupo A, sempre constituído dos melhores resultados para cada padrão quantificado.

Como se pode observar (Tabelas 10, 11, 12 e 13), o ácido clorogênico, dentre os quatro padrões avaliados, foi o que esteve presente em maior proporção na maioria dos acessos, sendo não detectado, apenas nos acessos 1495, 1633, 1718 e 1797. Foram obtidos para este padrão, 5 (cinco) grupos estatisticamente iguais (A-E) e verifica-se que o grupo A, foi constituído apenas

do acesso 1417, sendo este o acesso que apresentou maior teor deste ácido. O segundo grupo foi constituído apenas dos acessos 1642, 1584 e 1495. E o grupo E constituído pelo maior número de acessos avaliados (14) dos 29 extratos de *C. baccatum*.

O ácido cafeico (Tabela 11), foi apenas quantificado em 7 dos 29 acessos analisados, sendo o grupo A constituído dos acessos 1490, 1492 e 1417, sendo estes acessos os mais expressivos.

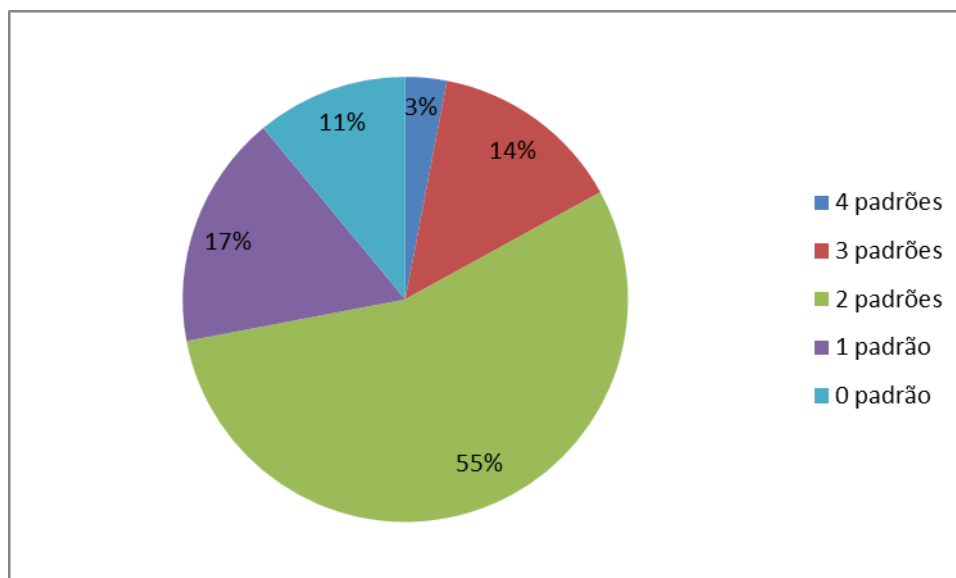
O flavonoide rutina (Tabela 13), entre os três flavonoides analisados foi o que esteve presente no maior número de acessos avaliados, porém com valores inexpressivos. Sendo detectado em 15 dos 29 acessos, e foram obtidos 5 (cinco) grupos estatisticamente iguais. Destacando-se apenas os acessos 1714 e 1417 como constituintes do grupo A.

O flavonoide quercetina (Tabela 12), apresentou-se minoritário nos acessos analisados, sendo somente o acesso 1494 constituinte do grupo A. Comparado aos teores quantificados nos melhores acessos em cada padrão quantificado, o flavonoide quercetina foi o que esteve em menor concentração (0,3426 mg/g).

Apenas o acesso 1492 mostrou a presença de 4 dentre os 5 padrões de substâncias fenólicas avaliadas, embora apenas traços de quercetina tenham sido verificados. Também foram detectados valores próximos a 0,5 mg/g de rutina e do ácido clorogênico e, aproximadamente 0,7 mg/g do ácido cafeico.

O flavonoide Apigenina não foi detectado em nenhum dos acessos. E o acesso 1633 não apresentou nenhum dos padrões fenólicos analisados neste gradiente de eluição.

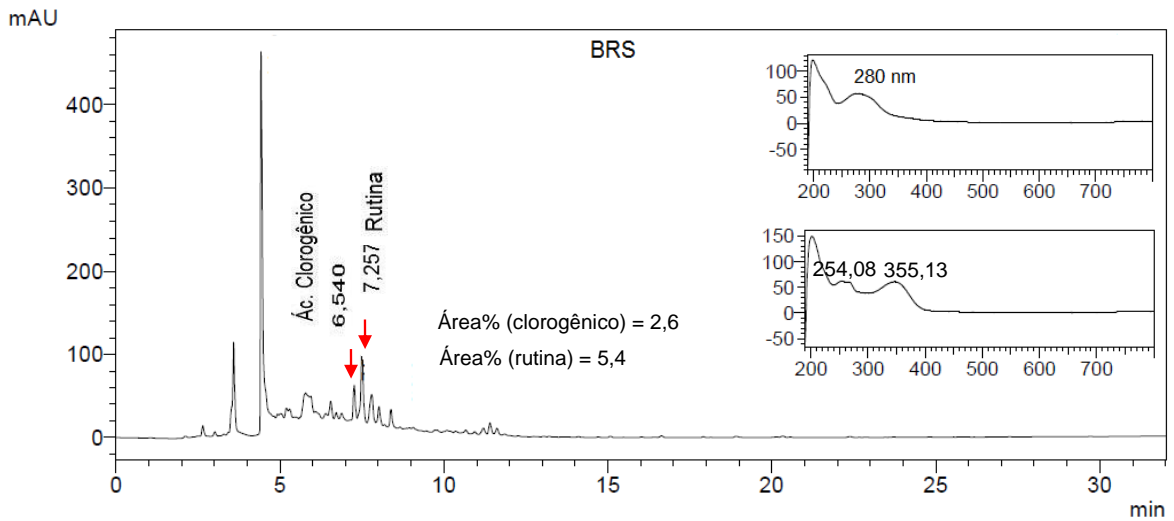
A figura 44 mostra a ocorrência dos padrões fenólicos em relação ao número de acessos avaliados.



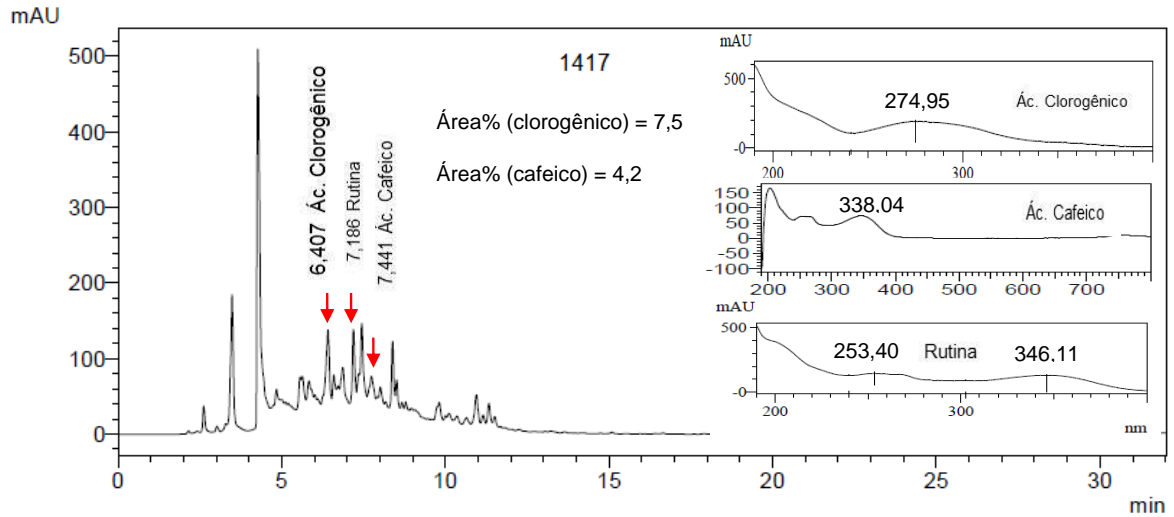
**Figura 44:** Relação de padrões quantificados por número de acessos avaliados

Portanto, como pode se observar (Figura 44) em relação à ocorrência dos padrões fenólicos a partir dos frutos de *C. baccatum* avaliados, apenas 11% dos acessos não apresentaram teores de nenhum dos padrões investigados. Dos 29 acessos investigados, cerca de 3% foram quantificados 4 dos 5 padrões avaliados. Para 14% dos acessos foram verificados teores de 3 padrões diferentes, já que 55% dos acessos apresentaram no mínimo 2 dos 5 padrões fenólicos e 17% apresentaram apenas 1 padrão quantificado.

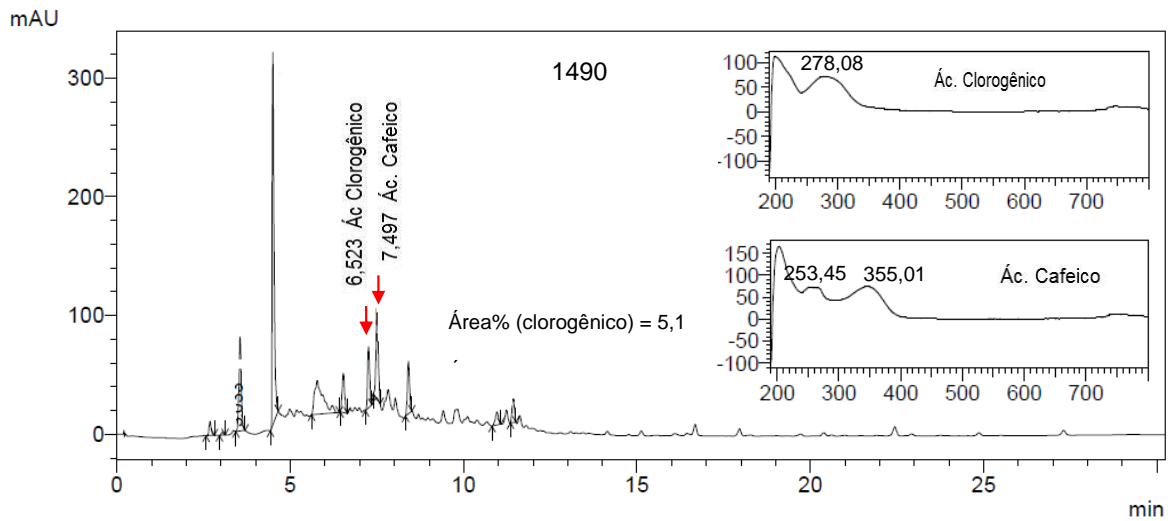
Para facilitar a visualização e a interpretação dos dados serão apresentados os cromatogramas (Figuras 45-70) dos acessos analisados, mostrando os compostos fenólicos detectados, o percentual de área e seus respectivos espectros de UV.



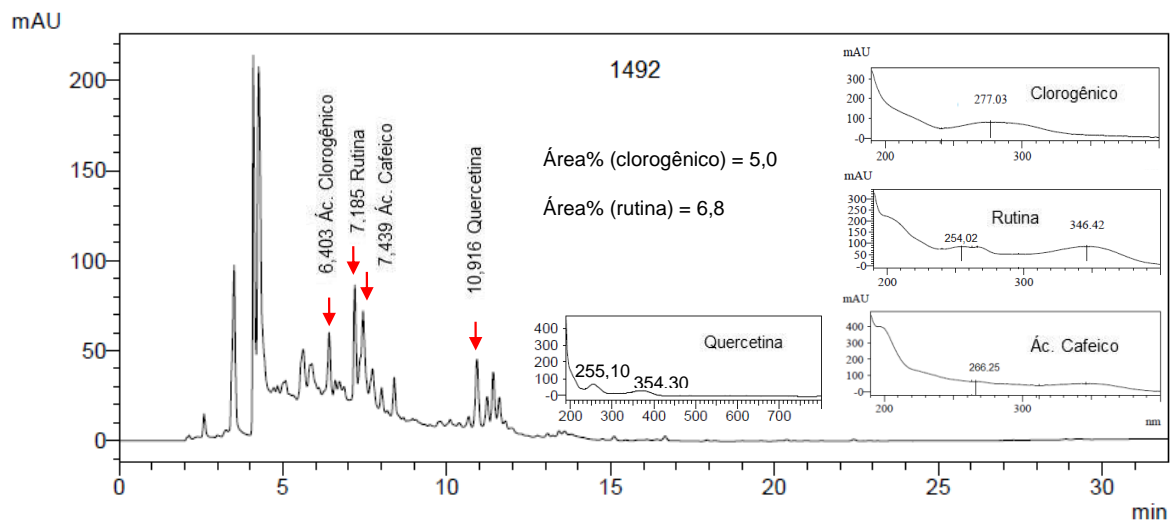
**Figura 45:** Cromatograma do acesso BRS avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



**Figura 46:** Cromatograma do acesso 1417 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico, rutina e de ácido cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

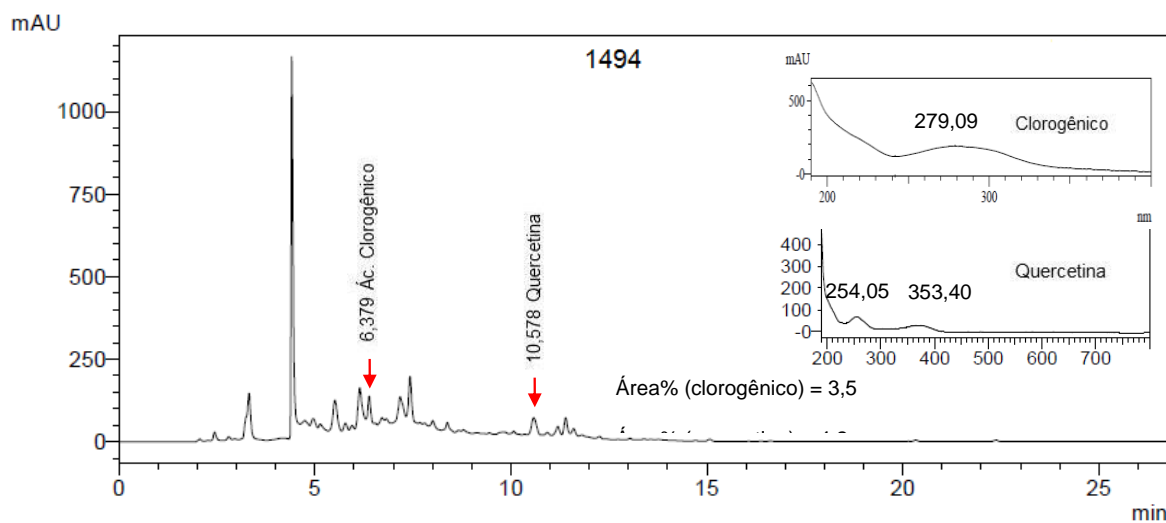


**Figura 47:** Cromatograma do acesso 1490 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e do ácido cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

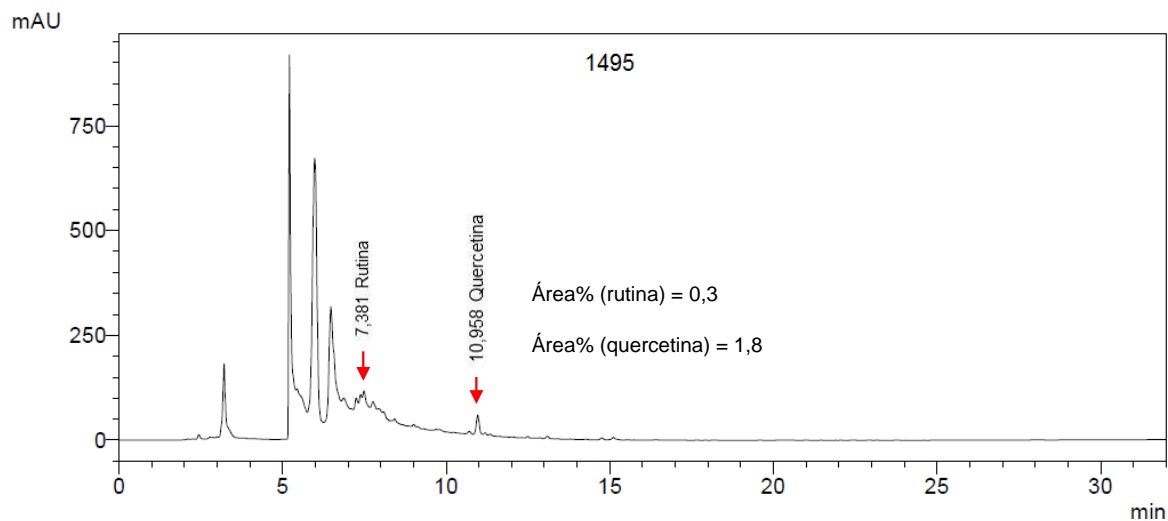


**Figura 48:** Cromatograma do acesso 1492 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico, rutina, ácido cafeico e de quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

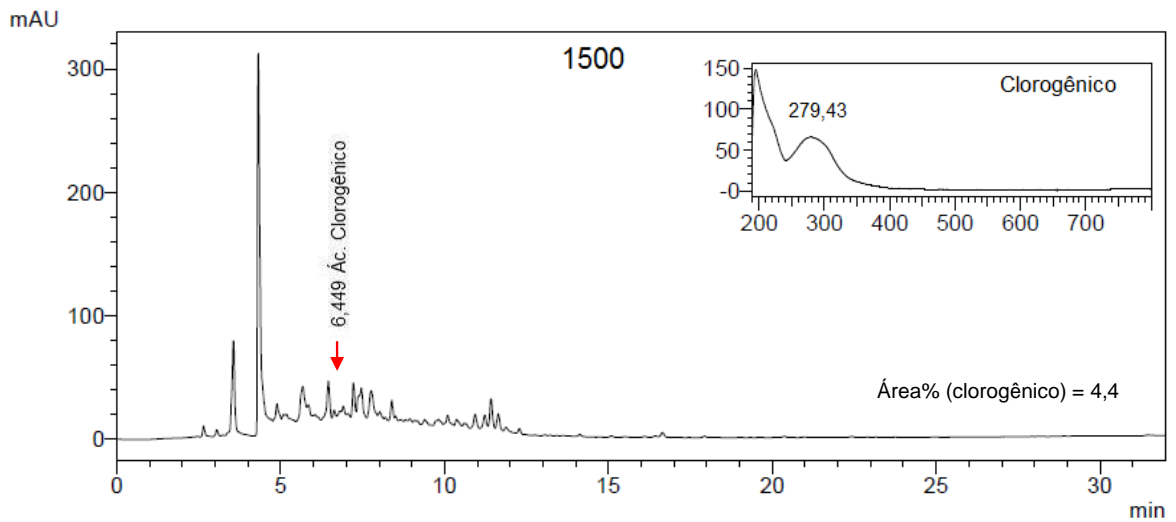




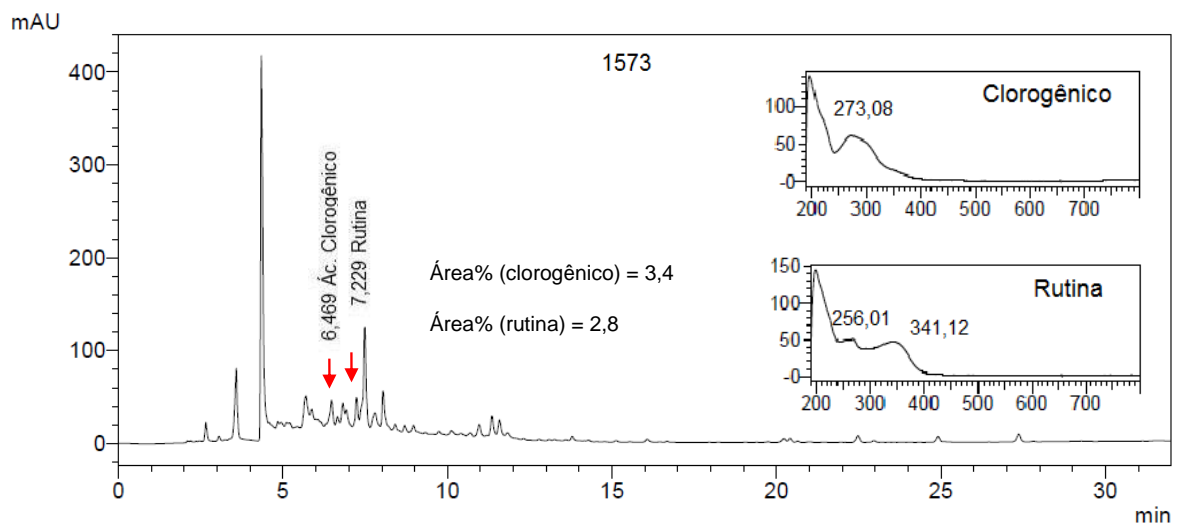
**Figura 49:** Cromatograma do acesso 1494 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



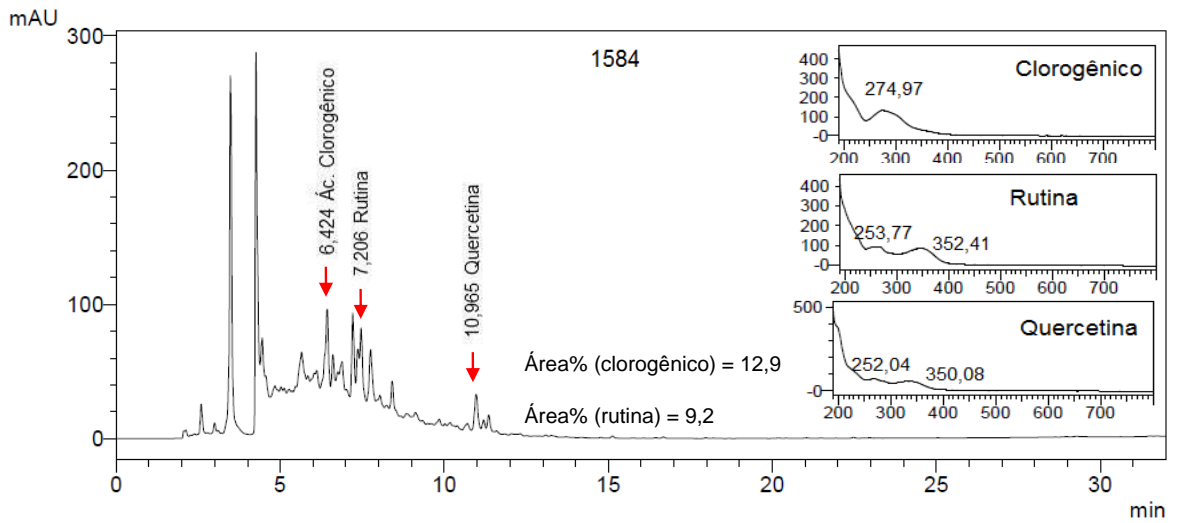
**Figura 50:** Cromatograma do acesso 1495 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV da rutina e da quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



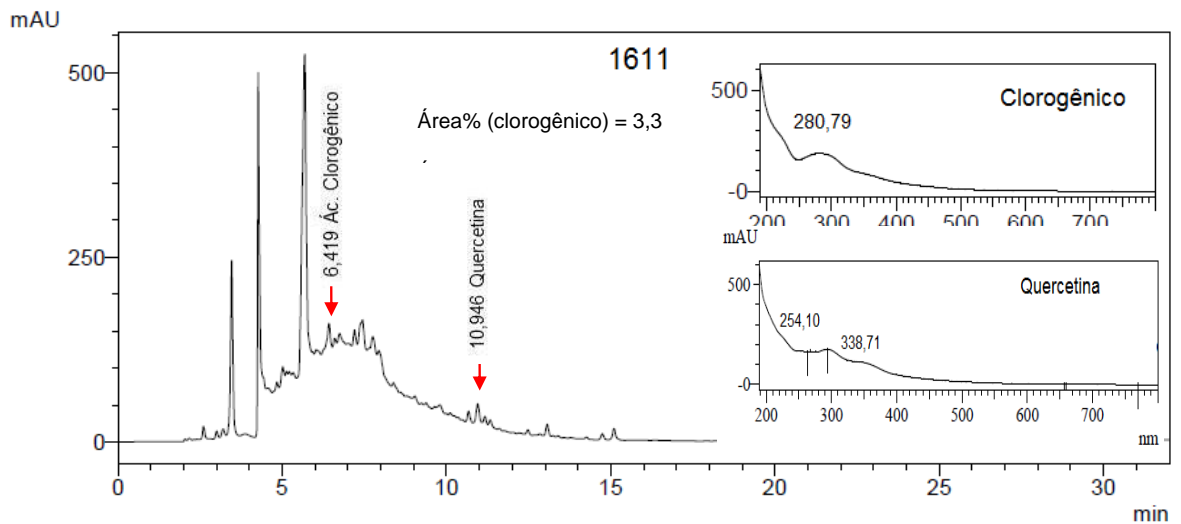
**Figura 51:** Cromatograma do acesso 1500 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1.



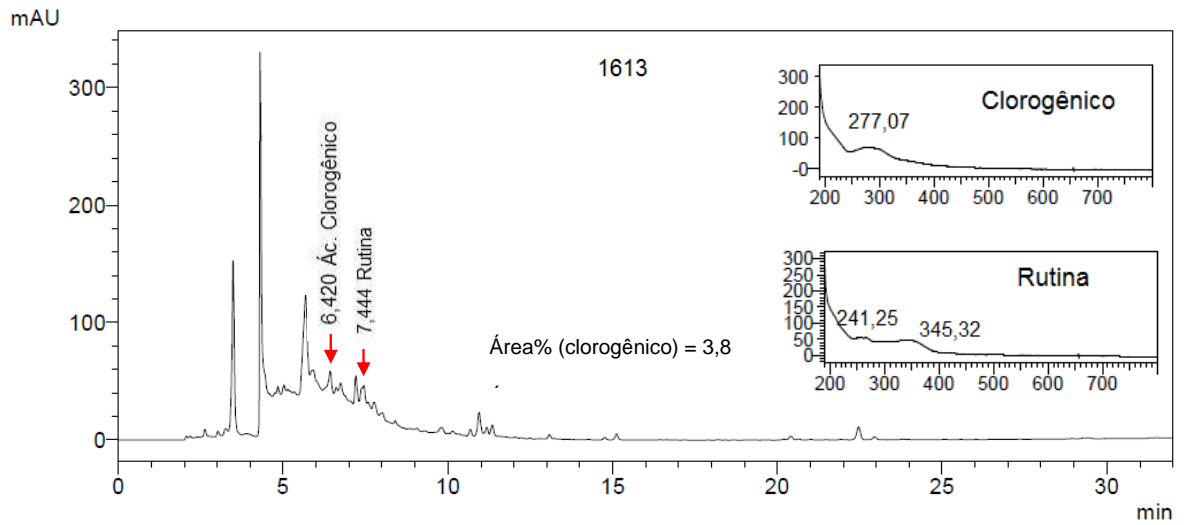
**Figura 52:** Cromatograma do acesso 1573 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



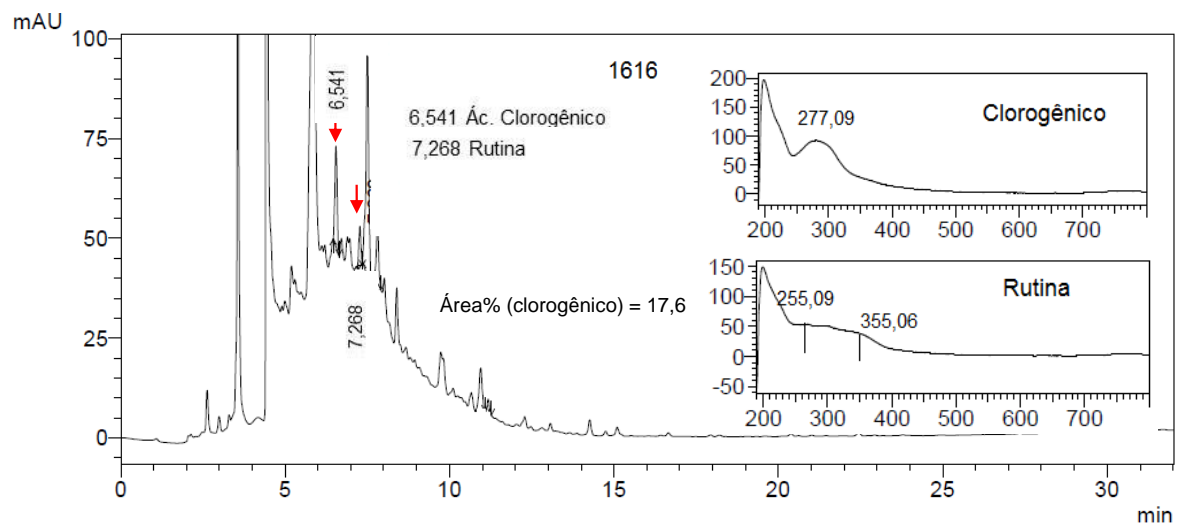
**Figura 53:** Cromatograma do acesso 1584 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico, rutina e de quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



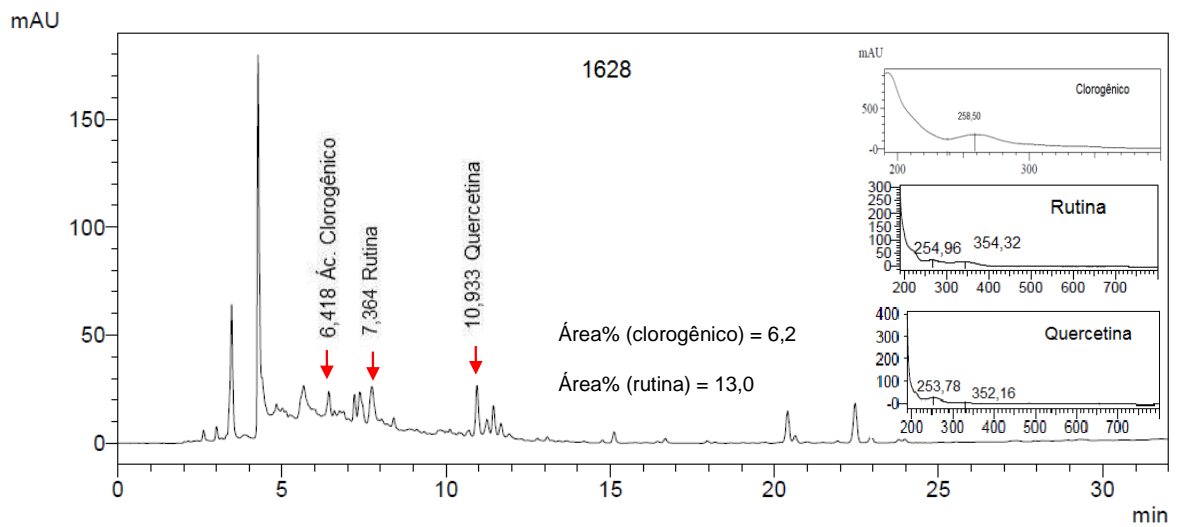
**Figura 54:** Cromatograma do acesso 1611 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



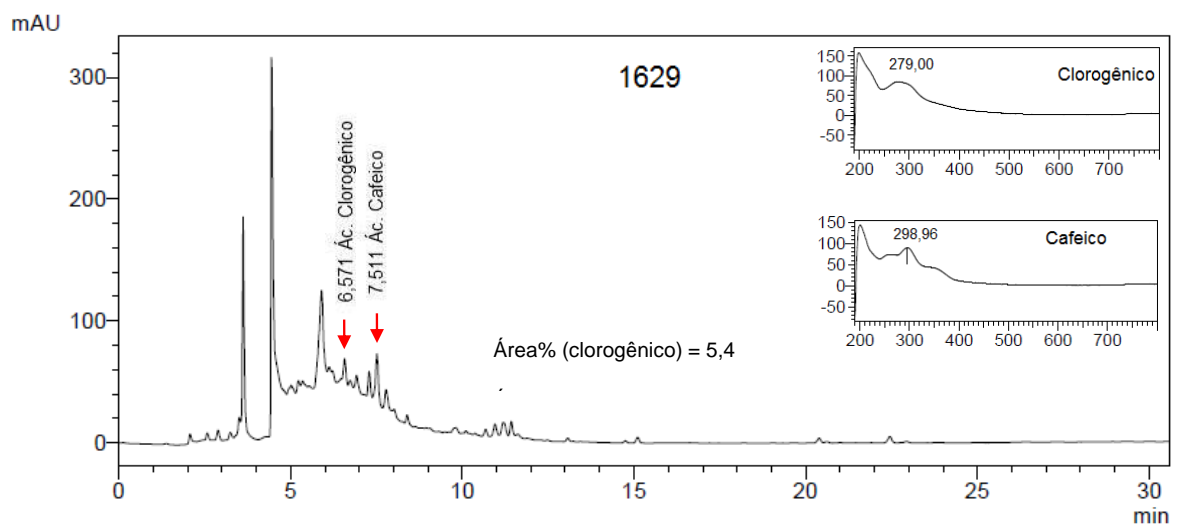
**Figura 55:** Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



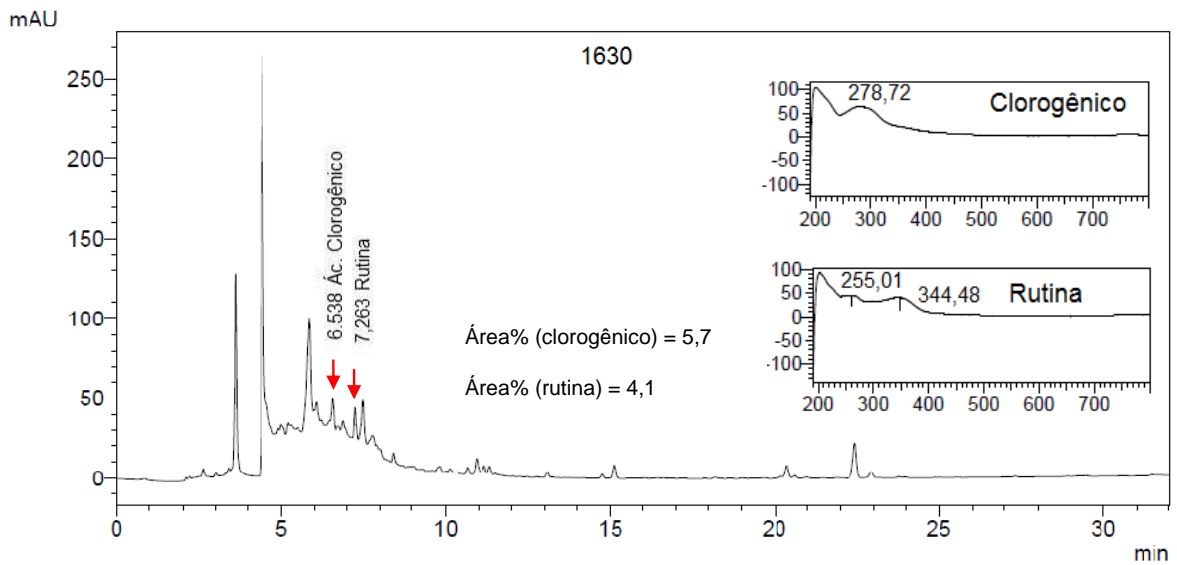
**Figura 56:** Cromatograma do acesso 1616 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



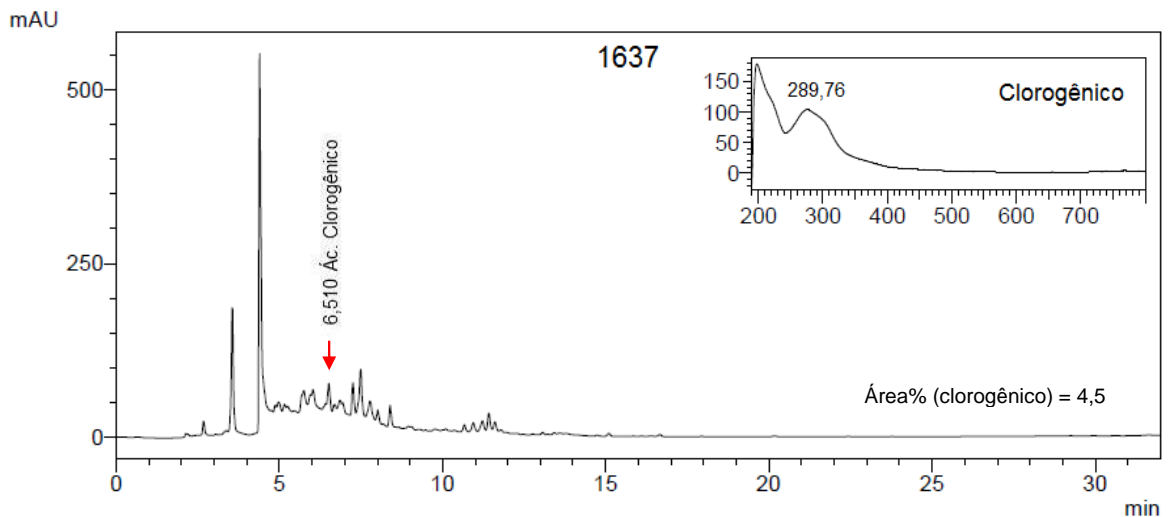
**Figura 57:** Cromatograma do acesso 1628 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico, rutina e de quercetina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



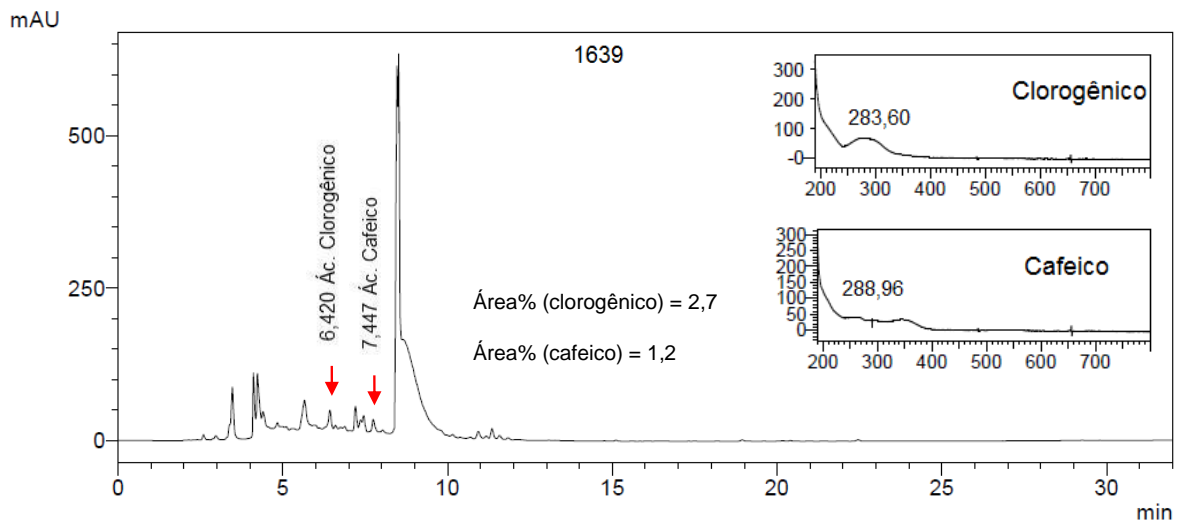
**Figura 58:** Cromatograma do acesso 1629 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV dos ácidos clorogênico e cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



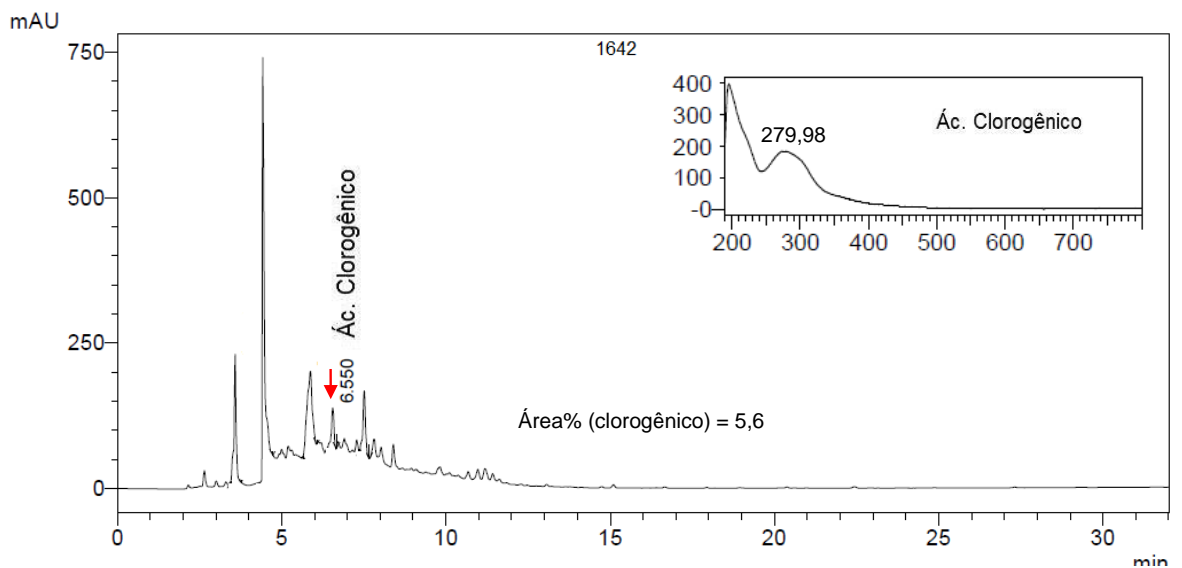
**Figura 59:** Cromatograma do acesso 1630 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



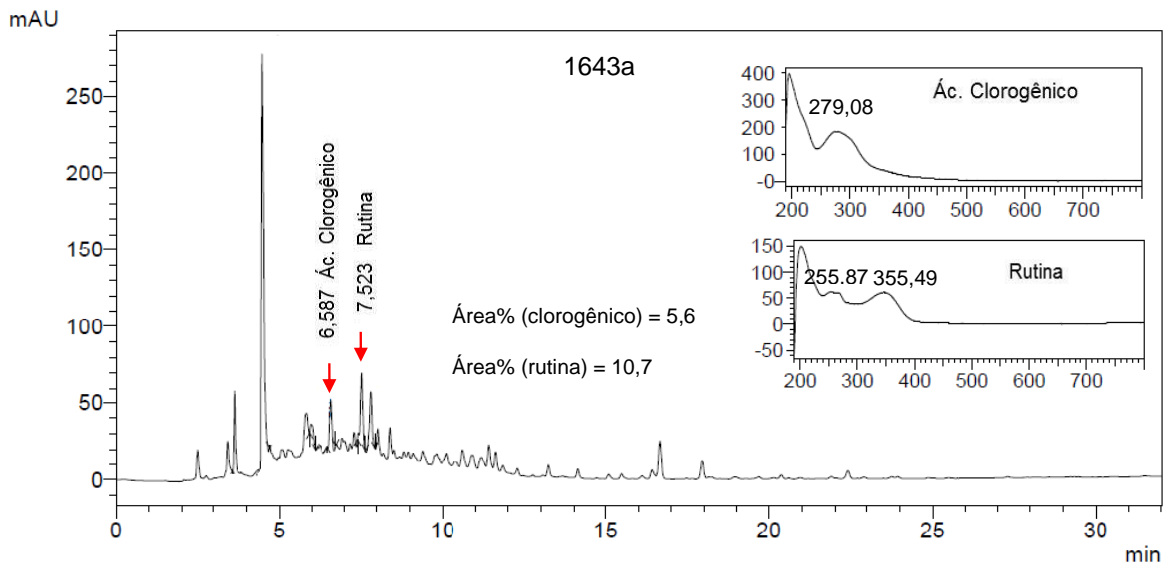
**Figura 60:** Cromatograma do acesso 1637 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1.



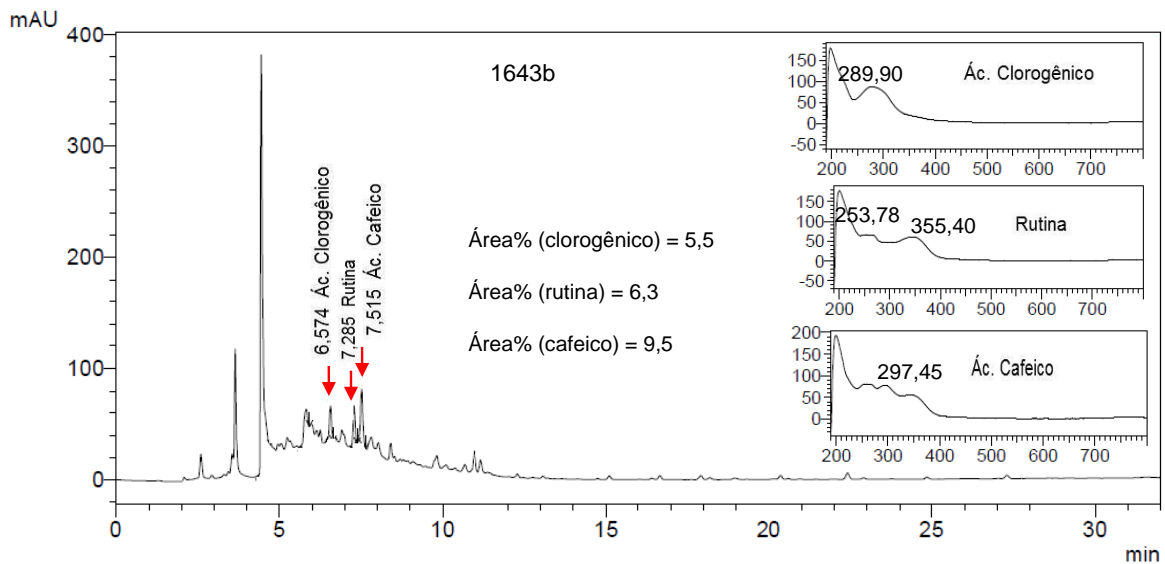
**Figura 61:** Cromatograma do acesso 1639 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e do ácido cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



**Figura 62:** Cromatograma do acesso 1642 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico que foi identificado e quantificado no gradiente 1.

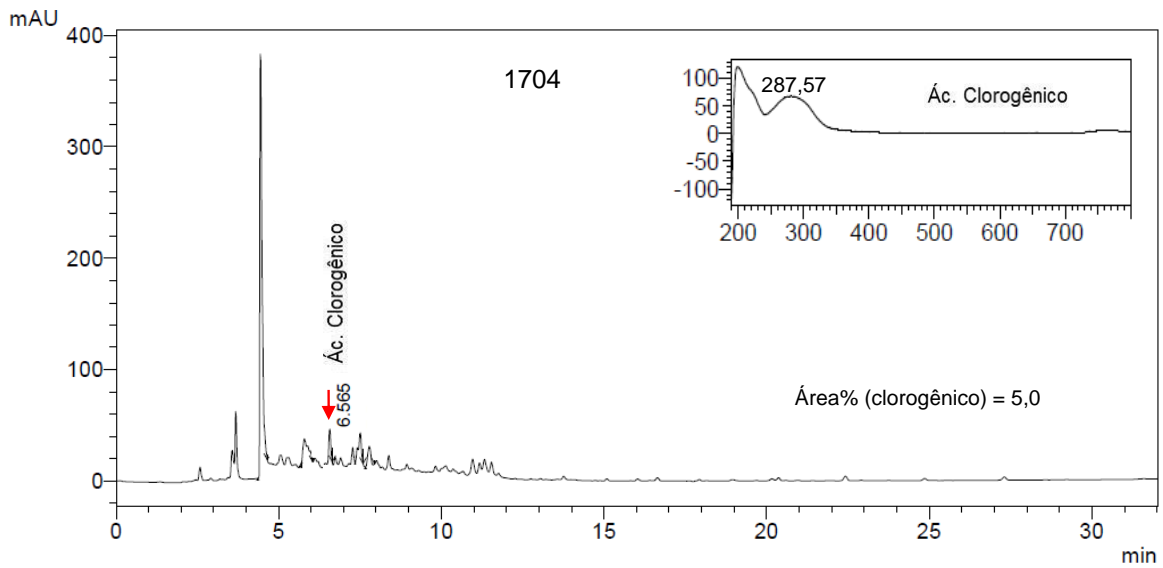


**Figura 63:** Cromatograma do acesso 1643a avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico e rutina que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

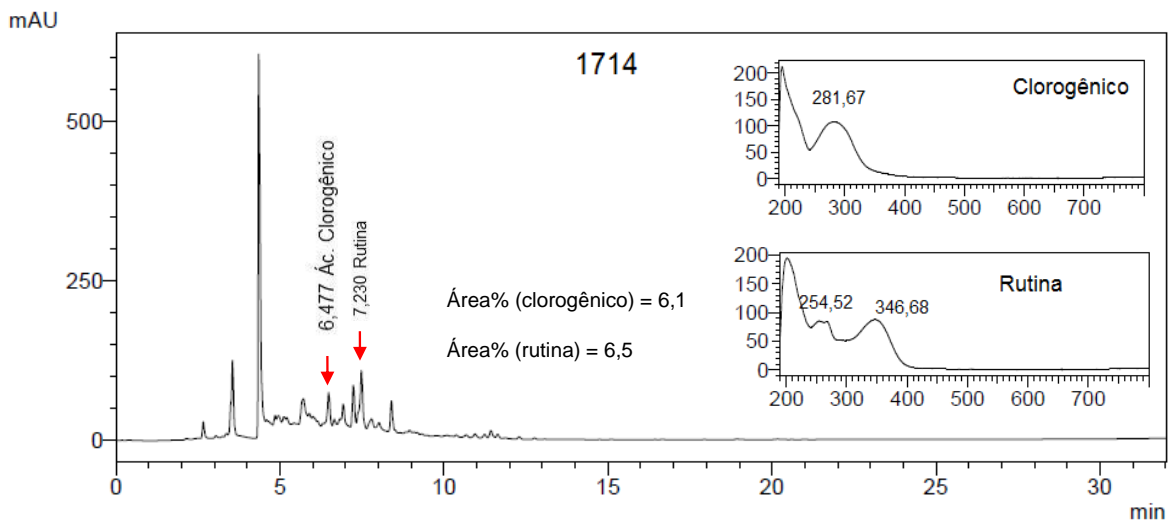


**Figura 64:** Cromatograma do acesso 1643b avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV de ácido clorogênico, rutina e ácido cafeico que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

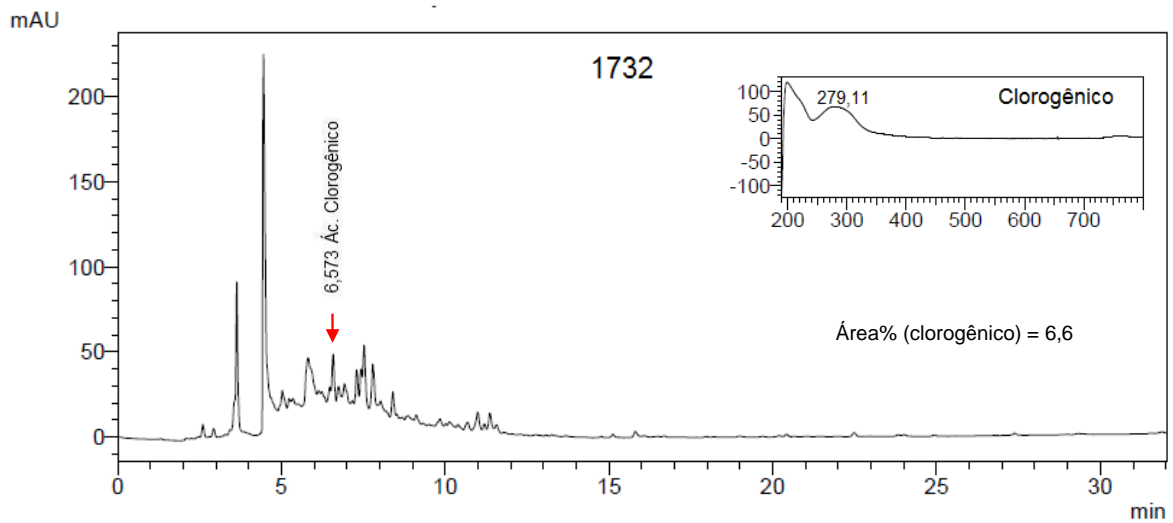




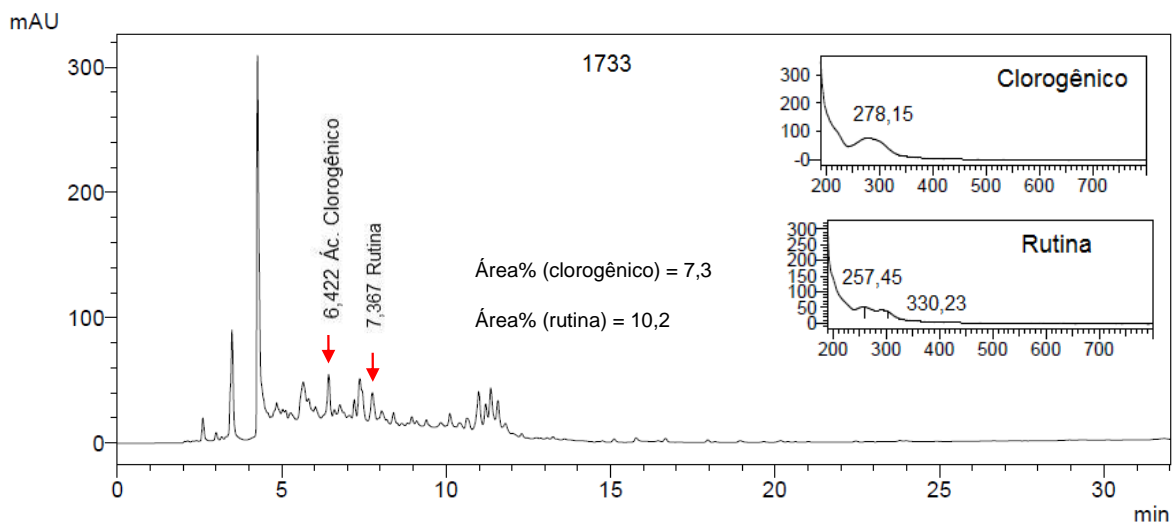
**Figura 65:** Cromatograma do acesso 1704 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado no gradiente 1.



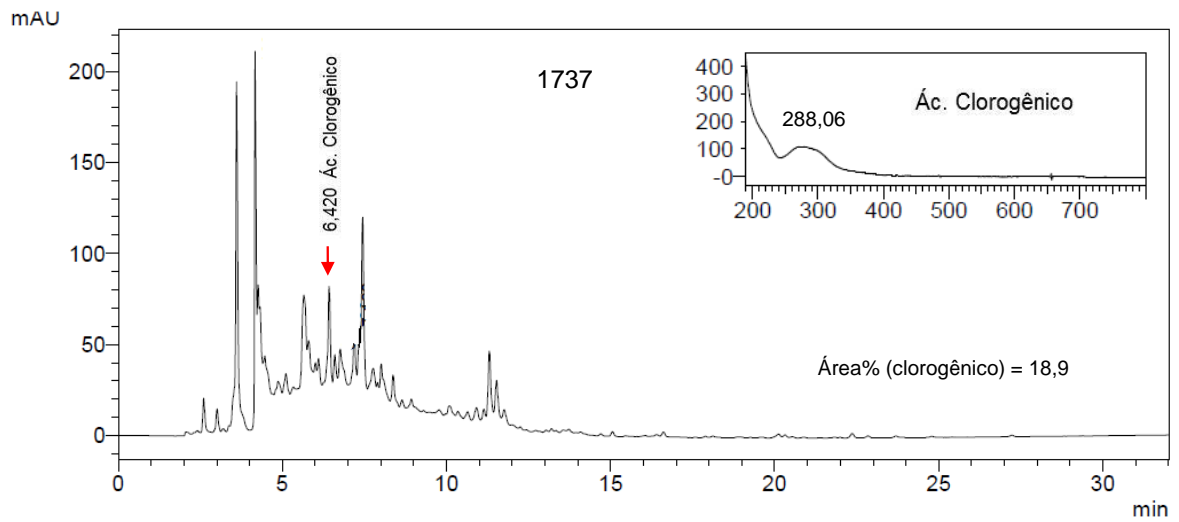
**Figura 66:** Cromatograma do acesso 1714 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina, que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



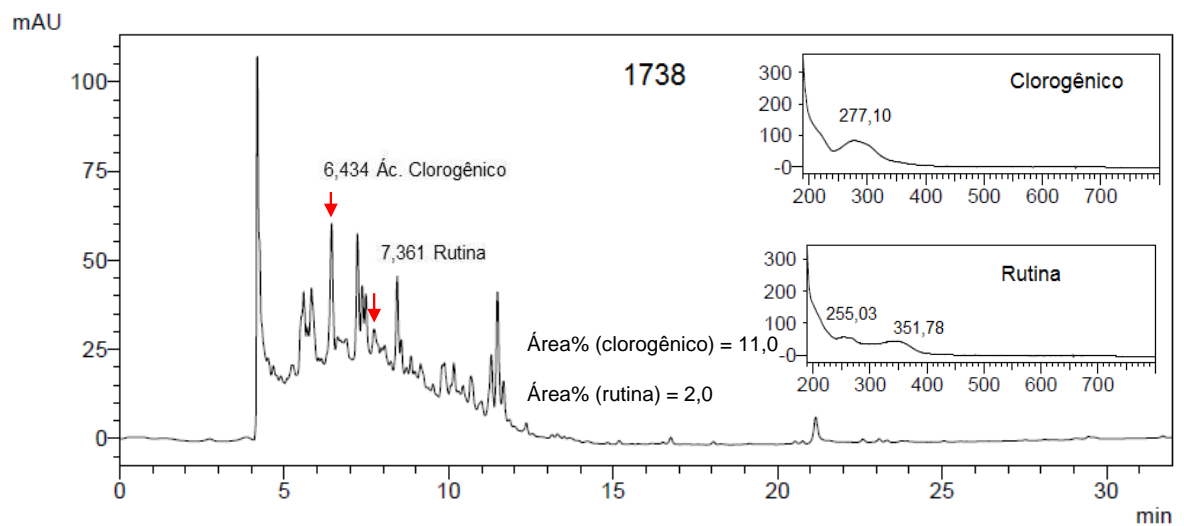
**Figura 67:** Cromatograma do acesso 1732 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado no gradiente 1.



**Figura 68:** Cromatograma do acesso 1733 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina, que foram identificados e quantificados no gradiente 1.



**Figura 69:** Cromatograma do acesso 1737 avaliado por CLAE e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado no gradiente 1.



**Figura 70:** Cromatograma do acesso 1738 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina, que foram identificados e quantificados no gradiente 1.

Com isso, foi possível identificar e quantificar os ácidos fenólicos e flavonoides nos diferentes acessos de *C. baccatum*, sendo que para os acessos em que foram quantificados os ácidos clorogênico e cafeico, verifica-se semelhança do espectro de UV com o espectro do ácido cinâmico.

Para os flavonoides quantificados nos diferentes acessos, também foi observado em seus espectros de UV as bandas de absorção máxima, características de flavonoides.

As pimentas do gênero *Capsicum*, são consideradas importantes sob o ponto vista econômico, devido à sua ampla comercialização e por outro lado, também são consideradas importantes, sob o ponto de vista nutricional, uma vez que são fontes de vitamina E, vitamina C, carotenoides, capsaicinoides e compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos.

Há relatos na literatura quanto à presença destes compostos nestas pimentas, embora para a espécie *C. baccatum*, sejam poucos. Dentre estes relatos, pode-se citar o trabalho de Wahyuni *et al.*, (2011), que observaram a presença do flavonoide quercetina e o trabalho de Kappel (2008), que em uma análise do perfil químico destas pimentas, verificou a presença do ácido clorogênico, do ácido cafeico e da rutina.

Desta forma, não foi encontrado nenhum relato na literatura sobre a quantificação de compostos fenólicos como os flavonoides quercetina e rutina, e ácidos fenólicos clorogênico e cafeico, para pimentas da espécie *C. baccatum*, a fim de se comparar com os resultados obtidos neste trabalho.

No entanto, em nível de comparação foram adotados valores encontrados nas demais espécies de pimentas deste mesmo gênero (*Capsicum*). Para a espécie *C. annum*, foram verificados diversos trabalhos em que os teores destes compostos foram quantificados. Chen e Kang (2013), em variedades de *C. annum*, puderam identificar e quantificar o ácido cafeico (0,12-1,32 mg/g), o ácido clorogênico (1,56-3,82 mg/g) e o flavonoide quercetina (8,86-10,27 mg/g), valores estes que corroboram com os encontrados neste estudo, diferindo apenas nos teores de quercetina, visto que, os valores encontrados por Chen e Kang (2013) estão bem acima do que foi observado nos acessos avaliados (0,343-0,020 mg/g de quercetina).

No trabalho de Nogueira (2013), ao se avaliar diferentes variedades de pimentas *C. annum*, também foi observado diferenças na quantificação dos

compostos fenólicos para cada variedade analisada. De forma que foi encontrado para o ácido clorogênico teores entre 0,034 mg/g e para quercetina teores entre 0,026 mg/g, valores muito próximos aos encontrados nos acessos 1584, 1611 e 1628 para quercetina, e valores inferiores aos encontrados nos demais acessos para ácido clorogênico (0,957-0,048 mg/g de clorogênico).

Quijada (2009), ao avaliar extratos de pimentas *C. annum*, encontrou teores entre 0,011 mg/g de ácido cafeico, 0,010 mg/g de ácido clorogênico e 0,004 mg/g de rutina. Destaca-se que os teores de rutina encontrados nos acessos avaliados são superiores aos encontrados por Quijada (2009).

A fim de se comparar com outros alimentos considerados importantes fontes de compostos fenólicos, verifica-se que o ácido clorogênico é comumente encontrado em café, tomates e frutas cítricas como maçãs. Estudos têm sugerido que a ingestão de alimentos considerados fontes deste ácido esteja associada à prevenção de doenças como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, entre outras relacionadas ao estresse oxidativo. Esta associação pode ocorrer devido ao ácido clorogênico ser considerado um bom antioxidante (Garambone e Rosa, 2007).

Na maçã encontra-se um teor de ácido clorogênico em torno de 0,510 mg/g e para tomates, que também são considerados fontes deste ácido, encontra-se em teores entre 0,13 e 0,38 mg/g (Garambone e Rosa, 2007). Desta forma, sugere-se que todos os acessos em que foi quantificado este ácido fenólico sejam considerados fontes desta substância.

A cebola amarela, a couve e o brócolis, são considerados importantes fontes de quercetina. Sendo a cebola amarela (0,30 mg/g) a que apresenta maiores teores em relação à couve (0,10 mg/g) e ao brócolis (0,03 mg/g) (Hollman e Arts, 2000). Valores estes que corroboram com os teores de quercetina encontrados nos acessos avaliados.

A tabela abaixo sumariza os dados obtidos a partir da quantificação destas substâncias em comparação com os dados extraídos da literatura. Vale ressaltar que a tabela 14 foi confeccionada a partir da observação do melhor resultado obtido para cada um dos padrões quantificados nos extratos dos acessos de *C. baccatum*.

**Tabela 14:** Comparação dos dados extraídos da literatura com os dados obtidos nos acessos avaliados neste trabalho pelo gradiente 1

<b>Autores</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Valores extraídos da literatura (mg/g)</b>	<b>Acessos</b>	<b>Valores Determinados neste trabalho (mg/g)</b>
Chen e Kang (2013)	Ác. Cafeico ( <i>C. annum</i> )	0,12-1,32	1490	0,7422
Quijada (2009)	Ác. Cafeico ( <i>C. annum</i> )	0,011	1492	0,6495
			1417	0,6131
Chen e Kang (2013)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	1,56-3,82	1417	1,542
Nogueira (2013)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	0,034		
Quijada (2009)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	0,010		
Jarambone e Rosa (2007)	Ác. Clorogênico (maçã)	0,510		
	Ác. Clorogênico (tomate)	0,13-0,38		
Chen e Kang (2013)	Quercetina ( <i>C. annum</i> )	8,86-10,27	1494	0,3426
Nogueira (2013)	Quercetina ( <i>C. annum</i> )	0,026		
Hollman e Arts (2000)	Quercetina (cebola)	0,30		
	Quercetina (couve)	0,10		
	Quercetina (brócolis)	0,03		
Quijada (2009)	Rutina ( <i>C. annum</i> )	0,004	1714	0,8168
			1417	0,7373

Comparando-se mais detalhadamente os resultados encontrados na literatura na quantificação destes compostos fenólicos com os obtidos por este trabalho, verifica-se que em relação ao ácido cafeico, o maior teor foi observado no acesso 1490, que por sua vez corrobora com os valores encontrados por Chen e Kang (2013). Para o ácido clorogênico, o acesso que apresentou maior concentração foi o 1417 e os valores para este ácido também estão de acordo com a literatura. Já o valor mais elevado de quercetina observado neste trabalho encontra-se, abaixo dos valores encontrados por Chen e Kang (2013), embora estejam acima dos valores determinados pelos demais pesquisadores, conforme mostrado na tabela 14. O acesso 1714 foi o que apresentou maior teor do

flavonoide rutina, que ao ser quantificado por Quijada (2009), apresentou níveis dos padrões avaliados muito inferiores aos verificados neste trabalho.

Assim, pode-se constatar que em relação aos teores dos compostos fenólicos quantificados nos acessos de pimentas *C. baccatum* analisados por CLAE pelo gradiente 1, foi satisfatório e estes valores corroboram com os valores determinados na literatura.

### 5.3.2- Gradiente 2

No intuito de se determinar maiores níveis de detecção destes compostos fenólicos foram testados dois tipos de gradientes de eluição para os 29 acessos. No gradiente 2, trabalhou-se com metanol na bomba A e água MiliQ acidificada (pH 3,2) com ácido fosfórico na bomba B (Tabela 4, pág. 40).

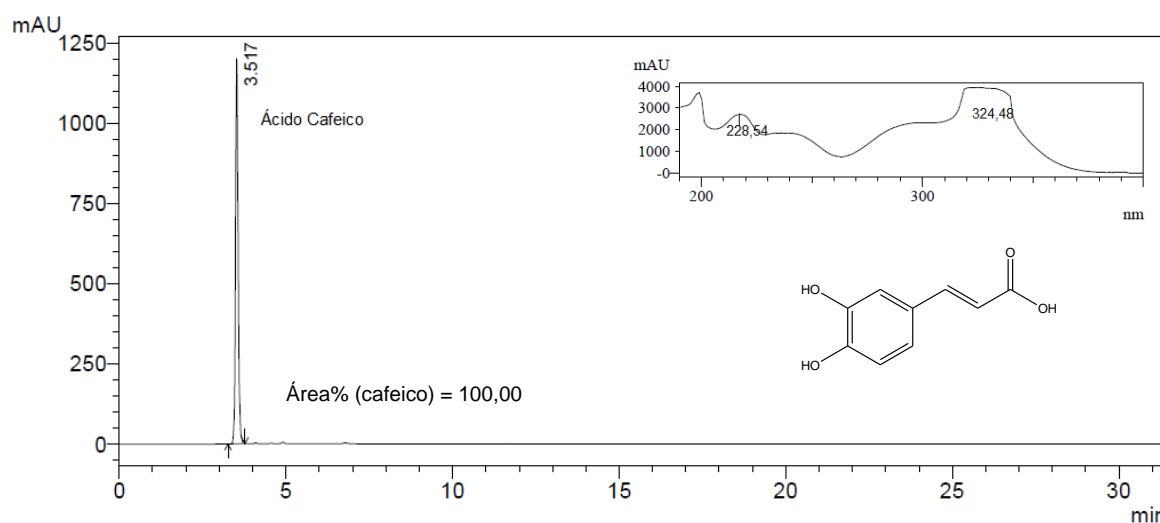
Para a avaliação dos teores dos ácidos fenólicos e flavonoides, também foram feitas curvas de calibração (pág. 42) de cada padrão fenólico, para que os tempos de retenção e os espectros de UV, destes pudessem ser comparados aos compostos identificados nos extratos etanólicos e desta forma serem quantificados.

Na tabela 15, constam os dados obtidos da CLAE para os padrões fenólicos e os respectivos comprimentos de onda dos ácidos fenólicos e flavonoides, além de seus respectivos percentuais de área (Área%).

Também para facilitar a comparação a partir dos dados obtidos para os extratos dos diferentes acessos de *C. baccatum*, os cromatogramas e os espectros de UV correspondentes aos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides analisados em CLAE neste gradiente constam nas Figuras 71-75.

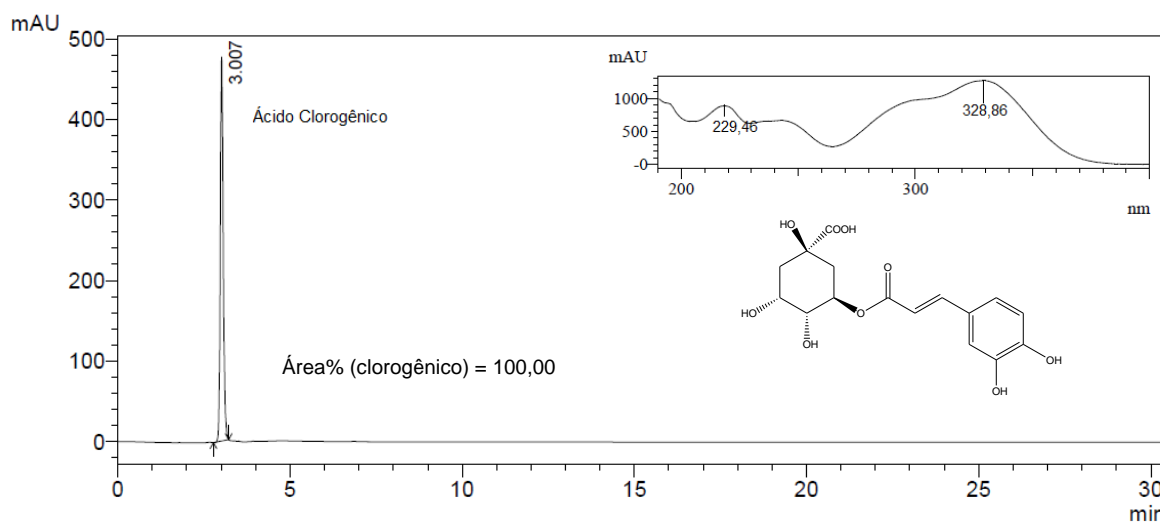
**Tabela 15:** Tempos de retenção ( $T_R$ ), comprimentos de onda ( $\lambda$  max) e percentual de área (Área %) dos padrões fenólicos analisados por CLAE no gradiente 2.

<i>Padões</i>	<i><math>T_R</math> (minutos)</i>	<i><math>\lambda</math> max (nm)</i>	<i>Área %</i>
Ácido Cafeico	3,517	323,73	100
Ácido Clorogênico	3,007	325,90	100
Rutina	3,891	255,49; 354,13	100
Quercetina	5,227	254,96; 368,84	100
Apigenina	6,831	267,18; 335,97	100

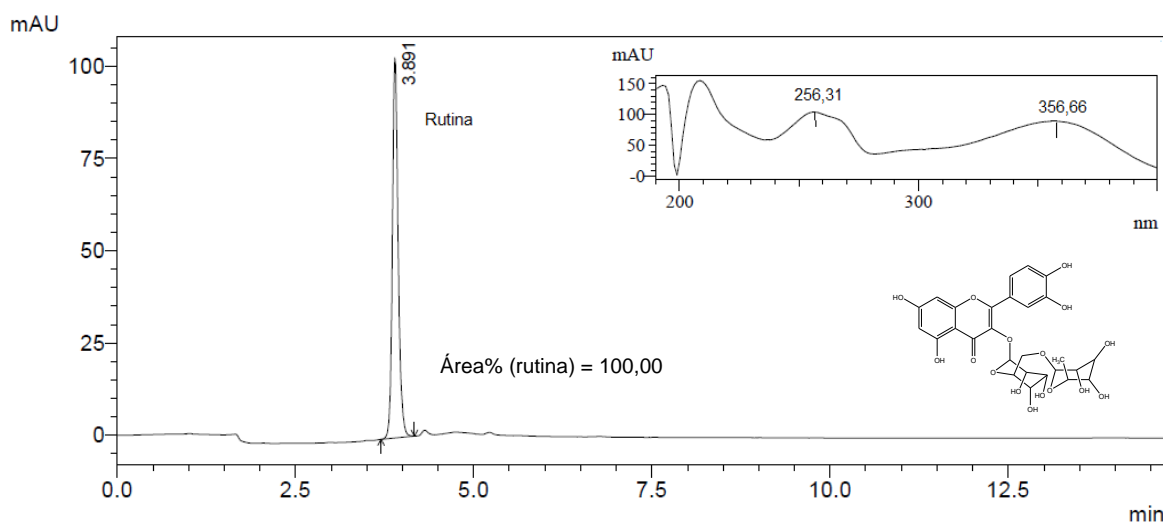


**Figura 71:** Cromatograma do padrão puro de ácido cafeico (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV.

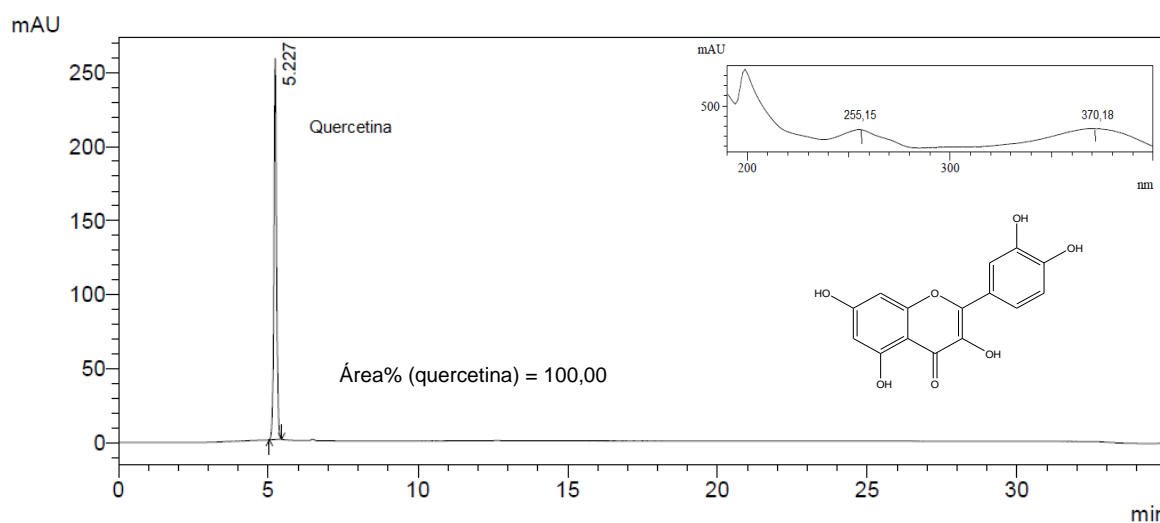




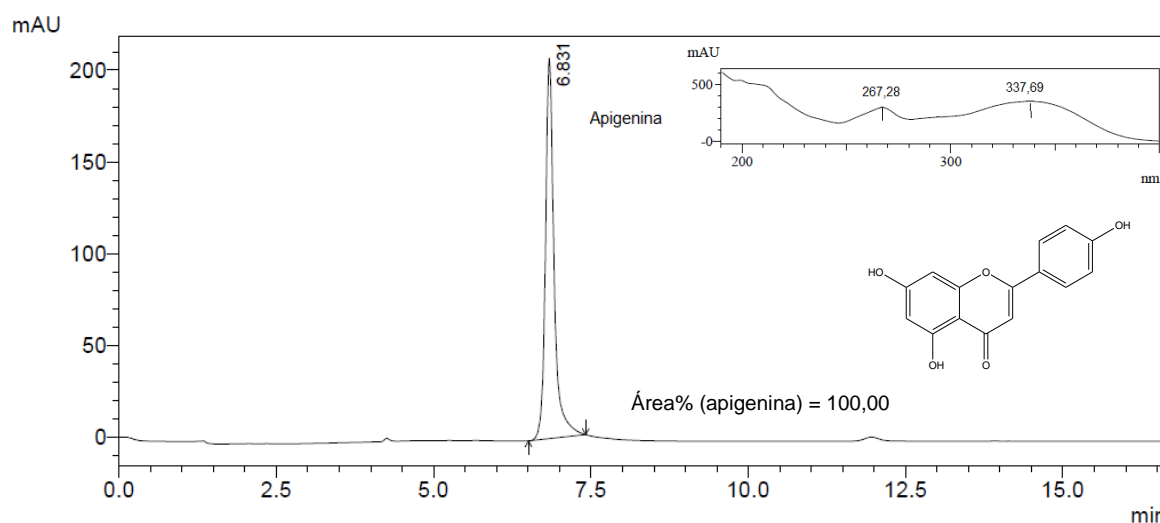
**Figura 72:** Cromatograma do padrão puro de ácido clorogênico (50 µg/mL) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV.



**Figura 73:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide rutina (50 µg/mL) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV.



**Figura 74:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide quercetina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV.



**Figura 75:** Cromatograma do padrão puro do flavonoide apigenina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) no gradiente de eluição 2 e seu respectivo espectro de UV.

Deste modo, ao observar os dois gradientes, verificou-se que no gradiente 2 houve uma diminuição dos tempos de retenção para todos os padrões. Estas divergências nos tempos de retenção ocorreram devido à diferença de polaridade entre o metanol e a acetonitrila usados no gradiente 1, visto que o metanol sendo mais polar, frente a uma coluna de fase inversa, carrega com mais facilidade os

compostos polares (Collins, Braga e Bonato, 1993). Além disto, o metanol é um solvente polar prótico, enquanto que a acetonitrila é um solvente polar aprótico.

Em relação aos espectros de UV, verificaram-se as mesmas bandas de absorção características das substâncias analisadas, conforme foi discutido no gradiente 1 (pág. 65-67).

Desta forma, a partir das análises dos tempos de retenção e dos espectros de UV e em relação às coinjeções dos padrões puros em CLAE, foi possível identificar os ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos obtidos dos acessos de pimentas *C. baccatum*.

Nas tabelas a seguir, constam os valores obtidos a partir da quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides, de acordo com o teste de Scott Knott em cada acesso avaliado, em nível de 5% de probabilidade, em que foram obtidos grupos estatisticamente iguais. O experimento foi realizado segundo delineamento em blocos casualizados a fim de se comparar os 29 acessos dentro do gradiente de eluição, sendo todas as análises realizadas em três repetições e expressas aqui as médias dos resultados.

**Tabela 16:** Resultados da quantificação do ácido clorogênico no gradiente 2

<b>Acesso</b>	<b>Concentração de ácido clorogênico (mg/g)</b>	<b>Comparações</b>
1633	0,5969	A
1643b	0,5593	A
1637	0,4675	A
1613	0,2499	B
1704	0,1628	B
1643 <sup>a</sup>	0,1513	B
1584	0,0680	B
1611	0,0633	B
1573	0,0256	B
1733	0,0227	B

Teste de Scott Knott. Obs: os acessos marcados da cor azul são os mais expressivos.

**Tabela 17:** Resultados da quantificação do ácido cafeico no gradiente 2

<b>Acesso</b>	<b>Concentração de ácido cafeico (mg/g)</b>
1613	0,5600
1616	0,0870

**Tabela 18:** Resultados da quantificação do flavonoide rutina no gradiente 2

<b>Acesso</b>	<b>Concentração de rutina (mg/g)</b>
BRS	0,4366
1417	0,1680

Ao se observar as tabelas 16 a 18, verifica-se que apenas 14 dos 29 acessos apresentaram teores de alguns dos padrões fenólicos analisados. Sendo que destes 14, o ácido clorogênico esteve presente em 10 destes 29 acessos.

Para o gradiente 1, o ácido clorogênico foi o padrão com maior ocorrência entre os acessos (25), porém observa-se uma discrepância muito grande entre o número de acessos em que o ácido clorogênico foi quantificado no gradiente 2 (10). Essa discrepância pode ser observada não só em relação ao ácido clorogênico, mas em relação a todos os outros padrões.

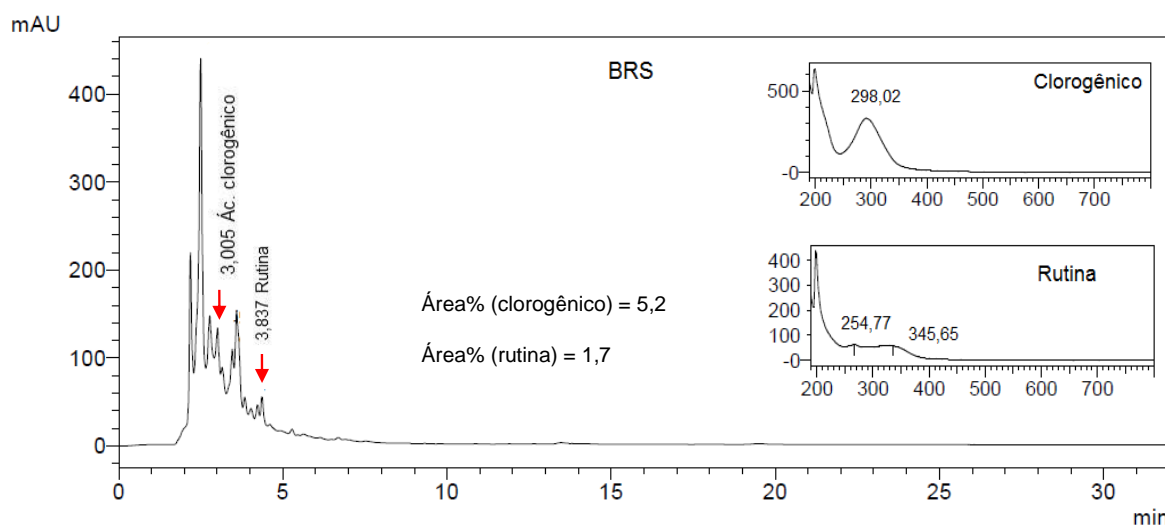
De acordo com o teste de Scott Knott para a quantificação do ácido clorogênico (Tabela 16), foram obtidos 2 grupos (Grupos A e B) e os acessos, 1633, 1643b e 1637, destacaram-se como os acessos que apresentaram maiores teores deste ácido (Grupo A).

Porém, para a quantificação do ácido cafeico e do flavonoide rutina (Tabelas 17 e 18), não foi necessária a realização de um teste estatístico devido ao número de acessos em que estes padrões foram quantificados. Desta forma, para o ácido cafeico, destaca-se o acesso 1613 (0,5600 mg/g), vale ressaltar que não se verifica teores deste ácido para este acesso no gradiente 1.

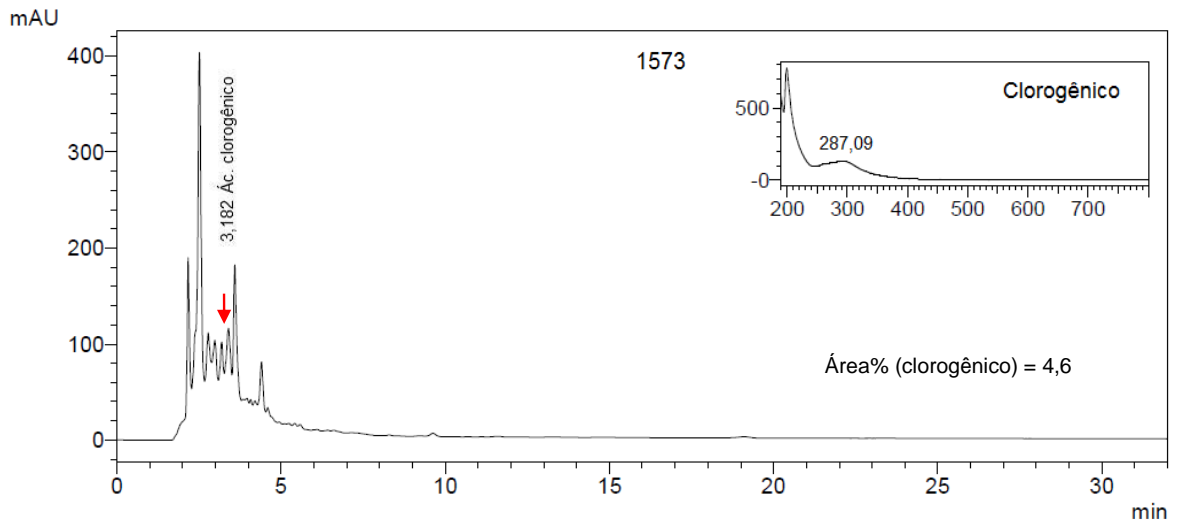
Os flavonoides quercetina e apigenina, não foram identificados e quantificados em nenhum dos 29 acessos para este gradiente de eluição. O flavonoide rutina foi quantificado apenas nos acessos BRS e 1417, sendo o BRS aquele em que a rutina está presente em maior proporção.

Apenas os acessos BRS e 1613, apresentaram a presença de dois padrões fenólicos ao mesmo tempo.

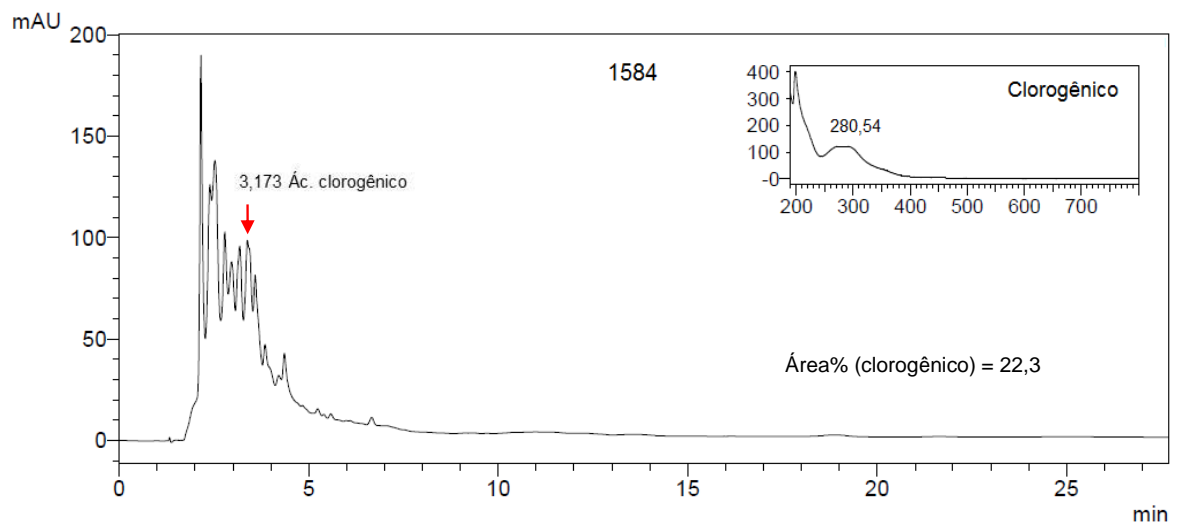
Para facilitar a visualização e a interpretação dos dados serão apresentados os cromatogramas (Figuras 76-86) dos acessos em que foram quantificados os compostos fenólicos, mostrando os compostos detectados e seus respectivos espectros de UV.



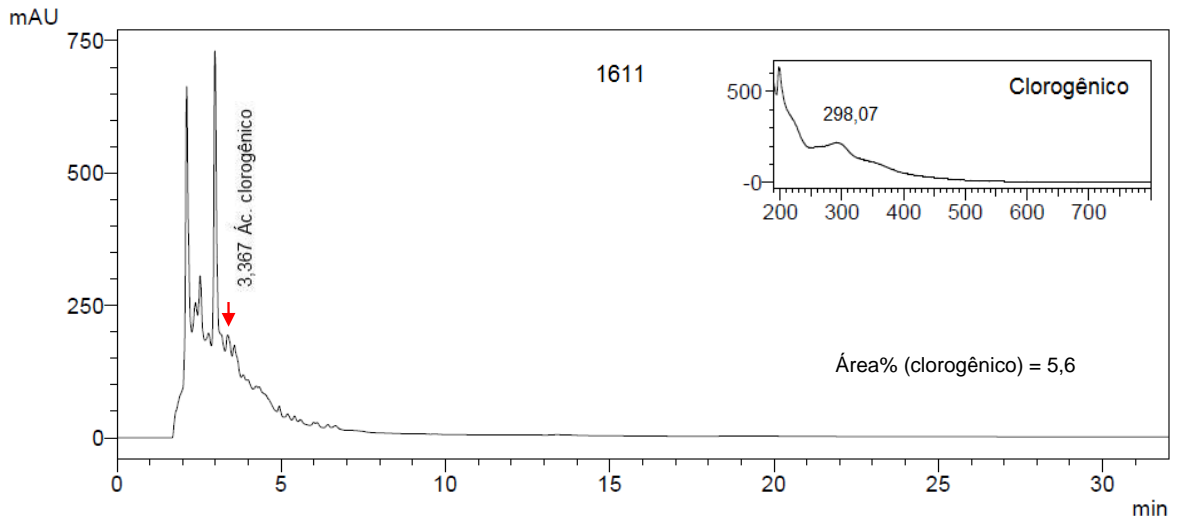
**Figura 76:** Cromatograma do acesso BRS avaliado por CLAE no gradiente 2 e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e da rutina, que foram identificados e quantificados.



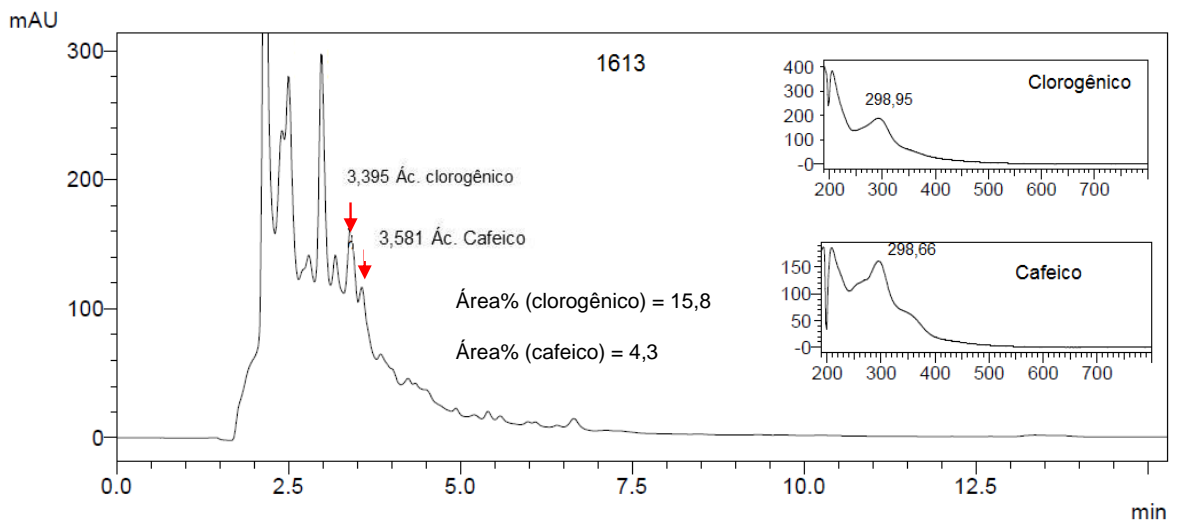
**Figura 77:** Cromatograma do acesso 1573 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



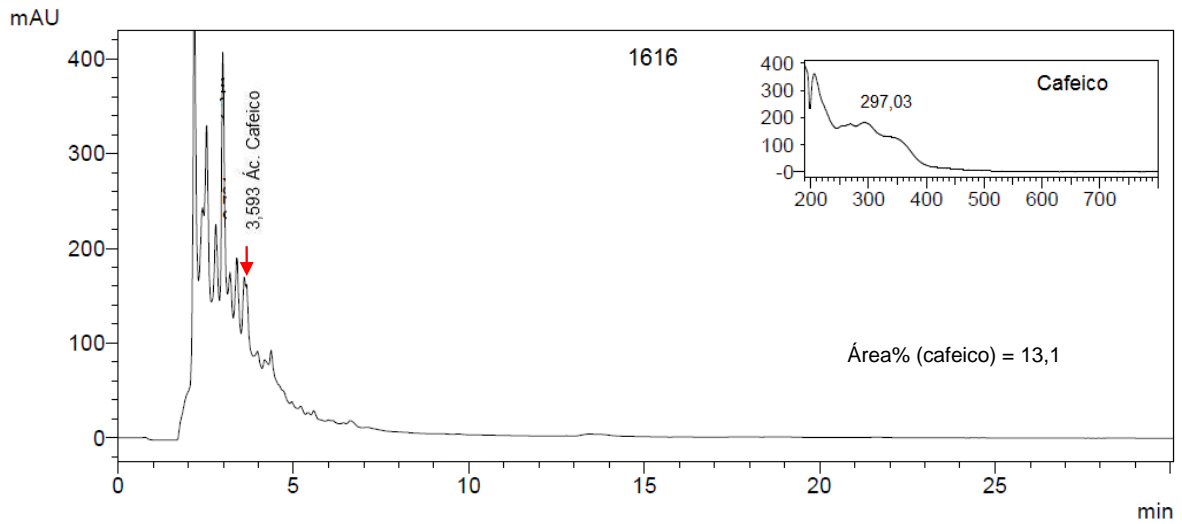
**Figura 78:** Cromatograma do acesso 1584 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



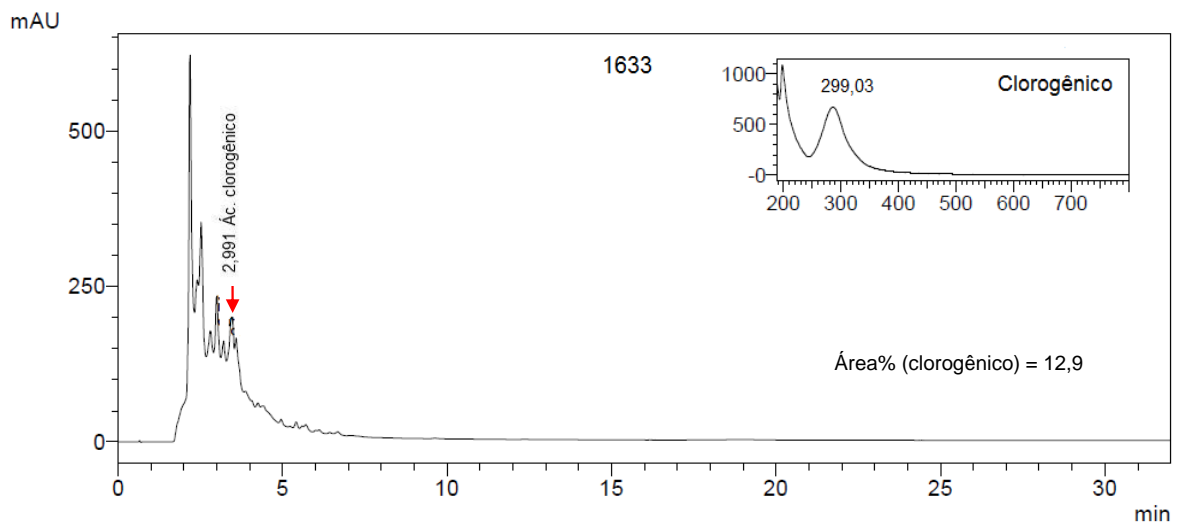
**Figura 79:** Cromatograma do acesso 1611 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



**Figura 80:** Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE no gradiente 2 e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico e cafeico, que foram identificados e quantificados.

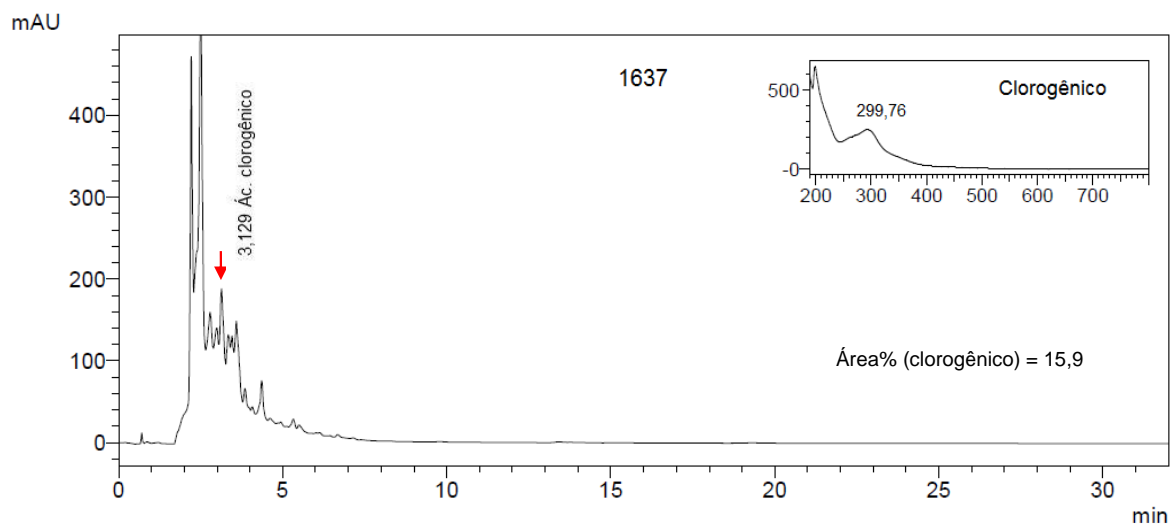


**Figura 81:** Cromatograma do acesso 1616 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido cafeico, que foi identificado e quantificado.

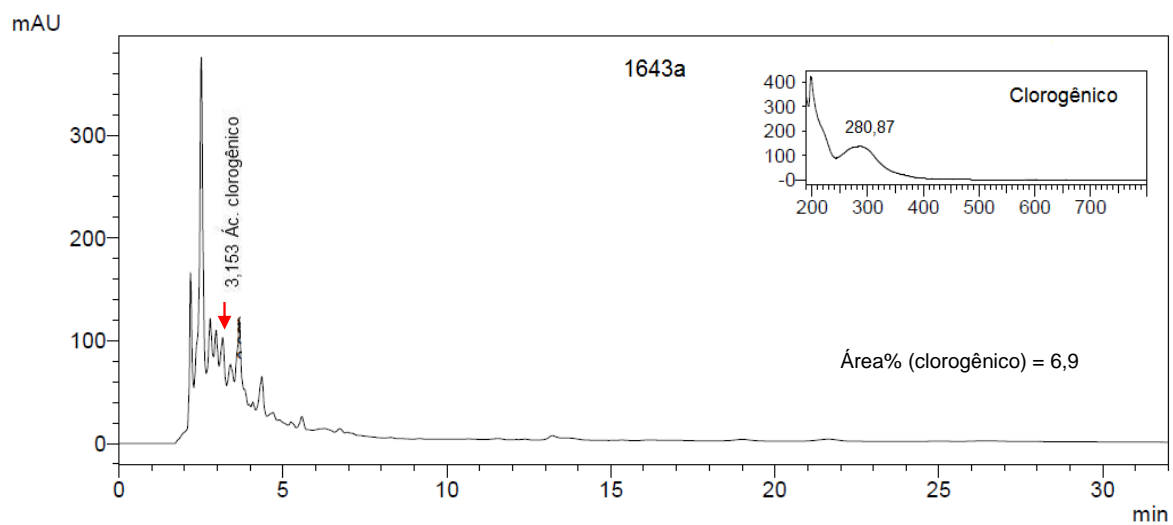


**Figura 82:** Cromatograma do acesso 1633 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.

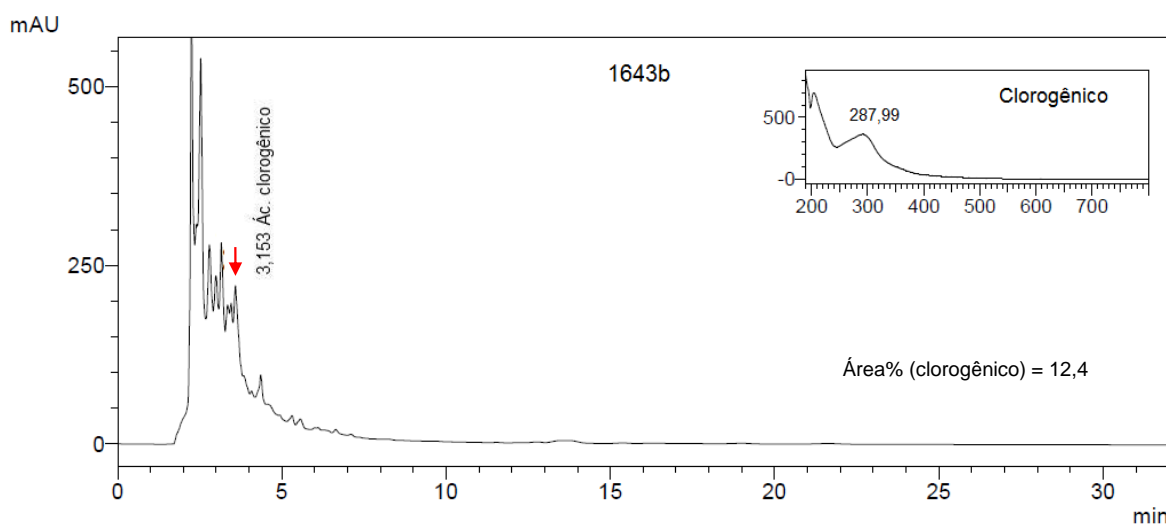




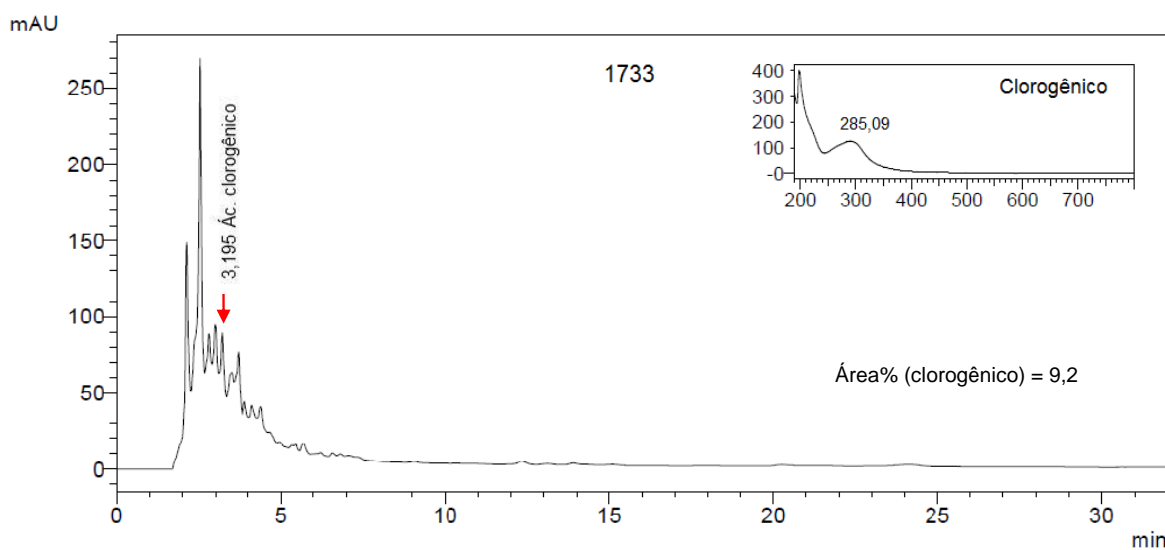
**Figura 83:** Cromatograma do acesso 1637 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



**Figura 84:** Cromatograma do acesso 1643a avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



**Figura 85:** Cromatograma do acesso 1643b avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.



**Figura 86:** Cromatograma do acesso 1733 avaliado por CLAE no gradiente 2 e o respectivo espectro de UV do ácido clorogênico, que foi identificado e quantificado.

Pode-se constatar que no gradiente 2, foram quantificados menores níveis das substâncias fenólicas avaliadas em relação ao gradiente 1. Diferenças como esta também foram verificadas no trabalho de Eloy et. al. (2012), em que a fase móvel acetonitrila:água mostrou-se mais adequada que metanol:água, estas diferenças podem ser atribuídas devido à baixa absorção da acetonitrila (190 nm)

na região do UV em relação ao metanol (205 nm) e a outros fatores como polaridade e viscosidade.

Segundo Skoog, et al (2002), obtêm-se melhores resultados em cromatografia líquida de fase inversa, quando a polaridade da fase estacionária é aproximadamente parecida com a polaridade do analito e a polaridade da fase móvel utilizada é consideravelmente diferente. Do que quando as polaridades do soluto e da fase móvel são próximas, mas diferentes da fase estacionária, neste caso a fase estacionária não é eficaz o suficiente para competir com a fase móvel pelos componentes da amostra, então, verifica-se tempos de retenção muito curtos, dificultando assim a análise. Portanto, verifica-se que o metanol por possuir polaridade ( $P' = 5,1$ ) um pouco inferior à da acetonitrila ( $P' = 5,8$ ), interage mais facilmente com os solutos polares, diminuindo o tempo de retenção dos padrões analisados, conforme foi observado (Tabela 13) e conseqüentemente diminuindo o fator de retenção ( $k'$ ), dificultando-se assim a análise destes compostos fenólicos no gradiente 2.

No entanto, os teores destes compostos encontrados nos demais acessos corroboram com os valores encontrados na literatura. Assim, para facilitar a visualização, a tabela abaixo, sumariza os dados obtidos a partir da quantificação dos compostos fenólicos em comparação com os dados extraídos da literatura. Vale ressaltar que a tabela 19 foi confeccionada a partir da observação do melhor resultado obtido para cada um dos padrões quantificados nos extratos dos 29 acessos de *C. baccatum*.

**Tabela 19:** Comparação dos dados extraídos da literatura com os dados obtidos nos acessos avaliados neste trabalho pelo gradiente 2

<b>Autores</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Valores extraídos da literatura (mg/g)</b>	<b>Acessos</b>	<b>Valores Determinados neste trabalho (mg/g)</b>
Chen e Kang (2013)	Ác. Cafeico ( <i>C. annum</i> )	0,12-1,32	1613	0,5600
Quijada (2009)	Ác. Cafeico ( <i>C. annum</i> )	0,011		
Chen e Kang (2013)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	1,56-3,82	1633	0,5969
Nogueira (2013)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	0,034	1643b	0,5593
Quijada (2009)	Ác. Clorogênico ( <i>C. annum</i> )	0,010	1637	0,4675
Jarambone e Rosa (2007)	Ác. Clorogênico (maçã)	0,510		
	Ác. Clorogênico (tomate)	0,13-0,38		
Quijada (2009)	Rutina ( <i>C. annum</i> )	0,004	BRS	0,4366

Conforme a tabela 19, o acesso 1613 apresentou maior concentração de ácido cafeico, estando este valor equivalente à faixa de valores encontrados na literatura. Os valores encontrados para o ácido clorogênico apresentaram-se abaixo dos valores observados por Chen e Kang (2013), embora estejam acima dos valores observados pelos demais pesquisadores. O acesso BRS foi o que apresentou maior percentual de rutina, sendo este valor superior ao encontrado por Quijada (2009). O flavonoide quercetina, não foi detectado em nenhum dos 29 acessos, embora tenha sido detectado no gradiente 1 em diversos acessos, nesse caso não pôde ser comparado a nenhum resultado observado na literatura.

Portanto, analisando-se os dois gradientes verifica-se que a partir do gradiente 1 foi possível se detectar níveis mais elevados na quantificação das substâncias avaliadas, além de ser quantificados teores de fenólicos em maior número de acessos analisados.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram obtidos extratos etanólicos de 29 acessos de pimentas da espécie *Capsicum baccatum*, pois a partir destes extratos, pôde-se avaliar o potencial antioxidante pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH, o teor de fenóis totais, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, além de ter sido quantificado por CLAE em dois gradientes de eluição diferentes, o conteúdo de alguns flavonoides e ácidos fenólicos como, rutina, quercetina, apigenina, ácido cafeico e ácido clorogênico.

Tal investigação foi feita no intuito de se obter um antioxidante natural que seja eficaz contra os processos de deterioração que encurtam o tempo de vida útil dos alimentos industrializados, visto que os antioxidantes sintéticos, mais utilizados para este propósito pelas indústrias alimentícias, apresentam certa toxidez (Degáspari, 2005; Melo e Guerra, 2002).

Na avaliação da atividade antioxidante, os extratos foram avaliados nas concentrações de 1000, 100 e 10 µg/ml e os resultados também foram expressos pelo EC<sub>50</sub>. Só foi observado potencial antioxidante nas concentrações de 1000 e 100 µg/ml, sendo que os resultados foram mais expressivos na maior concentração testada.

Destacam-se os acessos BRS, 1490, 1495, 1611, 1613, 1629, 1630, 1633, 1639, 1642, 1643a, 1732, 1738 e 1797, que obtiveram 100% de atividade. Sendo estes considerados os de ação mais efetiva quando atuantes como antioxidantes. Portanto, estes resultados corroboram com os de outros pesquisadores que também verificaram altos potenciais antioxidantes para pimentas desta mesma espécie.

Para avaliação do teor de fenóis totais, os resultados foram expressos de acordo com o teste de Scott Knott, em razão da significância dos acessos na análise de variância em nível de 5% de probabilidade. Foram obtidos 21 grupos estatisticamente iguais, e verifica-se que o acesso BRS, foi o que apresentou maior conteúdo de fenóis totais, seguido dos acessos 1643b, 1611, 1417, 1494, 1613 e 1584, que também se destacaram nesta análise.

Estes resultados também estão de acordo com os resultados verificados por outros pesquisadores, como Zimmer et al. (2012), Kappel (2007), entre outros. Sendo que para alguns acessos, como por exemplo, o BRS, o teor de fenóis totais se manteve acima dos valores observados na literatura.

Não se pode afirmar que haja relação entre o potencial antioxidante e o teor de fenóis totais, visto que, para alguns acessos há uma forte evidência, como no caso do acesso BRS, que se destaca por seu alto potencial antioxidante e seu elevado teor de fenóis totais, no entanto para os demais acessos tal relação não é observada.

O fato de não se encontrar associação entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante pode ser explicado por diversos fatores, sugere-se que a atividade antioxidante possa ser devida ao sinergismo presente entre a mistura de diferentes compostos antioxidantes, ou pode estar relacionada a outros compostos que não foram estudados neste trabalho, como os carotenoides e capsaicinoides que também atuam como antioxidantes.

Para a quantificação dos compostos fenólicos por CLAE, trabalhou-se com dois gradientes de eluição diferentes: gradiente 1 (água MiliQ acidificada e acetonitrila) e gradiente 2 (metanol e água MiliQ acidificada).

A identificação destes compostos nos extratos dos acessos de pimentas foi feita comparando-se os tempos de retenção, os espectros de UV e através de co-injeções dos padrões comerciais puros. Para cada padrão foram feitas curvas de calibração com seis concentrações diferentes (50 a 2 µg/ml), para cada gradiente. Os 29 acessos foram comparados em nível de 5% de significância, em cada gradiente, utilizando o teste de Scott Knott.

No gradiente 1, foi possível identificar e quantificar no mínimo um composto fenólico em 25 dos 29 acessos avaliados. Verificou-se que o ácido clorogênico esteve presente na maioria deles.

Comparando-se os teores obtidos destes compostos com os observados por outros pesquisadores, verificou-se que o acesso 1490 apresentou maior nível de ácido cafeico, para o acesso 1417 o maior teor de ácido clorogênico foi detectado, já o acesso 1494, que mostrou o maior teor de quercetina, esteve abaixo do encontrado na literatura, porém no acesso 1714 o qual apresentou maior concentração de rutina, esteve acima dos teores verificados por outros pesquisadores.

No gradiente de eluição 2, só foi possível quantificar no mínimo um padrão em 14 dos 29 acessos avaliados. Sendo o ácido clorogênico o mais abundante entre eles.

Os teores de flavonoides e ácidos fenólicos quantificados neste gradiente, também foram comparados com os dados extraídos da literatura e o acesso 1613 foi o que se destacou por apresentar maior concentração do ácido cafeico, o acesso 1633 foi aquele que apresentou maior teor de ácido clorogênico e o acesso BRS apresentou maior teor de rutina, sendo estes valores de acordo com o observado na literatura.

Desta forma, verifica-se que no gradiente 1 foi possível se quantificar níveis de padrões fenólicos avaliados em um maior número de acessos avaliados em relação ao gradiente 2. Este fato pode ser explicado devido à diferença polaridade entre o metanol e a acetonitrila, que proporciona diminuição nos tempos de retenção e fator de retenção ( $k'$ ) dos padrões no gradiente 2, dificultando assim a análise.

Também é importante ressaltar que não se pode afirmar que haja relação entre os teores de fenólicos quantificados em CLAE e os teores de fenóis totais obtidos pelo método Folin-Ciocalteu, visto que ao se observar o acesso BRS, verifica-se que este apresenta maior teor de fenóis totais por esta metodologia, contudo, os níveis de flavonoides e ácidos fenólicos quantificados em CLAE são inexpressivos.

Desta forma, sugere-se que esta discrepância possa estar relacionada com a presença nestes acessos de outras substâncias fenólicas que não foram analisadas neste trabalho de pesquisa.

Com isso, pode-se concluir que os acessos BRS, 1643a, 1611 e 1613, se destacam entre os demais acessos, pois podem ser considerados bons antioxidantes e fontes de compostos fenólicos. Desta forma, sugere-se que estes

sejam utilizados como antioxidantes naturais pelas indústrias de alimentos de forma que possam aumentar o tempo de vida útil dos alimentos.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Androutsopoulos, V.P.; Papakyriakou, A.; Vourloumis, D.; Tsatsakis, A.M.; Spandidos, D.A. (2010) Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrate and inhibitors of cytochrome p450CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*, v.126, 9–20.

Afanas'ev, J. B.; Dorozhko, A. J.; Brodskill, A. V.; Kostyuk, V. A.; Patapovitch, A. I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, Amsterdam, v. 38, p. 1763-1769.

Alvarez-Parrilla, E., et al. (2011) Antioxidante Activity of Fresh and Processed Jalapeno and Serrano Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p.163-173.

Anônimo (2012) Antioxidantes Naturais. Vegetais, frutas, ervas, especiarias e chás. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/129.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/129.pdf)> Acesso em 02 de agosto de 2012.

Aaraújo, J. M. A. (2008) *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 596p.

Bae, H.; Jayaprakasha, G.K.; Jifon, J.; Patil, B. S. (2012) Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Journal Food Chemistry*, v. 130, p.751-758.

Baggio, S. R., Bragagnolo, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24. p.64-70.

Bailey, A. E. (1996) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley. New York, , 5th ed, v. 3.

Bizzo, H. R.; Lopes, D.; Antoniassi, R.; Oliveira, D. R.; Ribeiro, C. S. C. (2004) Processo de obtenção de oleorresina de pimenta (*Capsicum spp*). *Comunicado Técnico 75 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Rio de Janeiro – RJ.

Bogusz, J. S.; Tavares, A. M.; Teixeira, F. J.; Zini, C. A.; Godoy, H. T. (2012) Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum spp.*) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International*, v. 48, p. 98–107.

Boue, S.M.; Carter-Wientjies, C.H.; Shih, B.Y.; Cleveland, T.E. (2003) Identification of flavones aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, v. 991, p. 61–68.

Bozkurt, H. (2006) Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science*, v. 73, p. 442–450.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30.

Castelo-Branco, V. N.; Torres, A. G. (2011) Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*. 24(1):173-187.

Castro, S. M.; Saraiva, J. A.; Domingues, F. M. J.; DELGADILLO, I. (2011). Effect of mild pressure treatments and thermal blanching on yellow bell peppers (*Capsicum annuum L.*). *LWT- Food Science and Technology*, 44(2), 363–369.

Carvalho, S. I. C.; Bianchetti, L. B. Sistema de produção de pimentas. 2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>>. Acesso em: 05 de maio de 2012.

Carvalho, J.C. T.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P. (1999) Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre – Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC.

Castelo-Branco, V. N.; Torres, A. G. (2011) Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição, Campinas*, vol. 24, no 1, p. 173-187, jan./fev.

Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G.; Augusto, O. (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, v.30, n.2, p.441-449.

Chen, L.; Kang, Y.H. (2013) Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *Journal of Functional Foods*, p.702-701.

Chuah, A.M.; Lee, Y. C.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Yin, L.J.; Matoba, T. (2008) Effect of cooking on the antioxidante properties of coloured peppers. *Food Chemistry*. v.111, p. 20-28.

Cichewicz, R. H.; Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chili peppers (*Capsicum species*) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 61–70.

Collins, C. H. (1993) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 5 ed. Campinas: Editora da UNICAMPI, p. 183-238.

Conforti, F.; Statti, G. A.; Menichini, F. (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*, v. 102, p. 1096–1104.

Anônimo (2013) Conselho Regional de Química (CRQ). Conceitos fundamentais de Cromatografia líquida de Alto Desempenho (HPLC). Minicursos 2010. São José do Rio Preto, 29 de maio. Disponível em: <[www.crq4.org.br](http://www.crq4.org.br)>. Acesso em dezembro de 2013.

Costa, L. M.; Moura, N. F.; Marangon, C.; Mendes, C. E.; Teixeira, A. O. (2009) Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. ISSN 0101-2061

Chun, S. S.; Vatem, D. A.; Lin, Y.T.; Shetty, K.; (2005) *Process Biochem.* v.40, p.809.

Davis, C.B.; Markey, C.; Busch, M.A.; Busch, K. W. Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007 (*in press*).

Deepa, N.; Kaur, C.; George, B.; Singh, B.; Kapoor, H.C. (2007) Antioxidant constituents ins some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *LWT Food Sci. Technol.* v.40, p.121-129.

Degáspari, C. H.; Waszczyński, N.; Prado, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências agrotécnica*. 29:617-622.

Deli, J.; Molnar, P.; Matus, Z.; Toth, G. (2001). Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; biosynthesis of carotenoids in red paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, p. 1517–1523.

Dionysio, R. B.; Meirelles, F. V. P. (2012) Conservação de alimentos. Disponível em:

<[http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL\\_conservacao\\_de\\_alimentos.pdf](http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_conservacao_de_alimentos.pdf)>. Acesso em: 13 de agosto de 2012.

Dorko, C. (1994) *Food Technol.* 48,33.

Dutra, F. L. G.; Ribani, R. H. (2010) Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-mate. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 119-123.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2005). Embrapa, ministry of agriculture, livestock and supply of Brazil. II National Meeting of Agribusiness Peppers (*Capsicum spp.*) and II Shows National Chili Derivative Products. Brasília, DF. Brazil.

Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F.; Tomás-Barberán, F. A. (1989) Current trends in plant flavonoid analysis. *In: Studies natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (ed). Amsterdam: Elsevier.

Fraser, P. D.; Bramley, P. M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.*, v.43, p.228-265.

Ganji, V.; Kafai, M.R. (2004) Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. *American Journal of Clinical Nutrition*.v.6, p.1500-1507.

Garambone, E. Rosa, G. (2007) Possíveis Benefícios do Ácido Clorogênico à Saúde. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.18, n.2, p. 229-235, abr./jun.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. (2007) Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p.374-381.

Gomes, F. S. (2007) Carotenóides: Uma possível proteção contra o desenvolvimento do Câncer. *Revista de Nutrição*, v.20, p.537-548.

Gomes, S. M. da C. (2010) *Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica*. Tese (Mestrado em Química de Controle de Qualidade e Ambiente) – Coimbra, Universidade de Coimbra.

Halliwel, B.; Gutteridge, J. M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, v. 186, p. 1–85.

Harbone, J.B. (1989) General procedures and measurement of total phenolics. *In: Dey, P. M.; Harbone, J. B. Methodos plant biochemistry*, v.1: pant phenolics. (ed). London: Academic press.

Harborne, J. B. (1994) Phenolics *In*: Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., BANTHORPE, D. V. *Natural Products. Their chemistry and biological significance*. 1. ed. New York: Longman scientific & Technical, p. 361-388.

Haslam, E.; J. (1996) *Nat. Prod*, v.59, p.205.

Hervert-Hernandez, D.; Sayago-Ayerdi, S.G.; GONI, I., (2010) Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.): antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3399–3406.

Hollman, P. C. H.; Arts, I. C. W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 7, p. 1081-1093.

Howard, L.R.; Talcott, S.T., Brenes, C.H.; Villalon, B. (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1713–1720.

Ikawa, M.; Schaper, T. D.; Dollard, C. A.; Sasner, J. J.; J. (2003) *Agric. Food Chem*,v.51, p.1811.

Kappel, V.D.; Costa, G.M.; Scola, G.; Silva, F.A.; Landell, M.F.; Valente, P.; Souza, D.G.; Vanz, D.C.; Reginatto, F.H.; Moreira, J.C. (2008) 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, p. 267–274.

Karre, L.; Lopez, K.; Getty, K. J.K. (2013) Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science* 94, 220–227.

Kikuzaki, H.; Nakatani, N. (1989) Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare* L). *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 519-524.

Kirschbaum-titze, P.; Hiepler, C.; Mueller-seitz, E.; Petz, M. (2002) Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50. 1260-1263.

Kollmannsberger, H.; Rodriguez-Burruezo, A.; Nitz, S.; Nuez, F. (2011) Volatile and capsaicinoid composition of aji (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* v. 91, p. 1598–1611.

Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244–282.

Lee, J.J.; Crosby, K.M.; Pike, L.M.; Yoo, K.S.; Leskovar, D.I. (2005) Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum spp.*). *Scientia Horticulturae*, v.106, p.341-352.

Lianda, R. L. P. (2009) *Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante*. Tese (Doutorado em Química dos Produtos Naturais) - Seropédica, Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

Lima, A. *Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)*. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo 182p.

Lisa, M.S.; Rahman, R.A.; Mandana, B.; Jinap, S.; Rahmat, A.; Zaidul, I.S.M.; Hamid, A. (2010) Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoids from *Strobilanthes crispus* (pecah Kaca). *Food and Bioprocess Processing*, v. 88, p. 319–326.

Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. (1970) Systematic identification of flavonoids. New York (USA): Springer-Verlag, p. 354.

Mccarty, T. L. B. (2008). Monitoring of US imports of peppers. United States International Trade Commission (USITC).

Manach, C.; Morand, C.; Demigne, C.; Tesier, O.; Regerat, F.; Remesy, C. (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 409, p. 12-16.

Marin, A.; Ferres, F.; Tomas-Barberan, F. A.; GIL, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52. 3861-3869.

Markhan, K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, p. 113.

Materska, M.; Perucka, L. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53. 1750-1756.

Meghvansi, M.K.; Siddiqui, S.; Khan, M.H.; Gupta, V.K.; Vairale, M.G.; Gogol, H.K.; Singh, L. (2010). Naga chilli: a potential source of capsaicinoids with broadspectrum ethnopharmacological applications. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, p. 1–14.

Melo, C.M.T., et al. (2011) 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, p.1-2.

Melo, E. A., Guerra, N. B. (2002) Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim da SBCTA*. 36:1-11.

Ministério da Saúde. (1988) Resolução nº 04 de 24 de novembro de 1988. Aditivos Intencionais. Brasília: Ministério da Saúde.

Mueller L., et al. (2005) The SOL Genomics Network, a comparative resource for the Solanaceae and beyond. *Plant Physiol*. 138:1310-1317.

Naczki, M.; Shahidi, F.; J. (2004) *Chromatogr.*, A, v.1054, p.95.

Naveena, B. M.; Sen, A. R.; Vaithyanathan, S.; Babji, Y.; Kondaiah, N. (2008) Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, v. 80, p. 304–308.

Nogueira, L. (2013) *Composição química e atividade antioxidante de diferentes variedades de pimento (Capsicum annum L.)*. Tesi (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança.

Nuez, F. (1995) El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Madri: Ediciones Mundi-Prensa.

Nunez, G. M. T.; Hafley, B. S.; Boleman, R.M.; Miller, R. K.; Rhee, K. S.; Keeton, J. T. (2008) Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. *Meat Science*, v. 80, p. 997–1004.

Ochi. T.; Takaishi, Y.; Kogure, K.; Yamauti L. (2003) Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annum*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1094-1096.

Oliveira, A. C.; Valenti, I. B.; Goulart, M. O. F.; (2009) Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702.

Otero, R.; Núñez, V.; Barona, J.; Fonnegra, R.; Jiménez, S. L.; Osorio, R. G., et al. (2000) Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 233–241.

Pedriali, C. A. (2005) *Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes*. Tesi (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Pereda, J. A. O.; Rodriguez, M. I. C.; Álvarez; L. F.; Sanz; M. L. G.; Minguillón; G. D. G. de F.; Perales; L. de la H.; Cortecero; M. D. S. (2005) *Tecnologia de Alimentos – Componentes dos Alimentos e Processos*. Artmed, Porto Alegre, v. 1, p. 15-19.

Pereira, V. R. (2008) *Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria de alimentos*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

Pino, J.; Gonzalez, M.; Ceballos, L.; Centurion-Yah, A. R.; Trujillo-Aguirre, J.; Latournerie-Moreno, L.; Sauri-Duch, E. (2007) Characterization of total capsinoids, colour and volatile compounds of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense jack*) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1682-1686.

Pitaro, S. P.; Jorge, N.; Fiorani, L. V. (2009) Efeito antioxidante do extrato de manjeriço em óleo de soja sob condições de oxidação. São José do Rio Preto.

Plochmann, K.; Korte, G.; Koutsilieri, E.; Richling, E.; Riederer, P.; Rethwilm, A.; Schreier, P.; Scheller, C.; (2007) Structure–activity relationships of flavonoids induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 460, p. 1–9.

Prado, A. (2009) Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Tesi (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – São Paulo, Universidade de São Paulo - USP.

Pruthi, J. S. (1980) Spices and condiments: Chemistry, microbiology, technology. New York, USA: Academic Press 449 p.

Quijada, D. M. A. M. (2009) *Contenido de Compuestos Fitoquímicos y su Relación con la Capacidad Antioxidante de Extractos de Pimientos (Capsicum annum L.) Cultivados en el Noroeste de Méxi.* Tesi (Mestrado em Biocências) – Universidad de Sonora.

Rafecas, M.; Guardiola, F.; Illera, M.; Codony, R.; Boatella, J.; (1998) Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. *Journal Chromatography*. 822:305.

Raghavan, S.; Richards, M. P. (2007) Comparison of solvent and microwave extracts of cranberry press cake on the inhibition of lipid oxidation in mechanically separated turkey. *Food Chemistry*, v. 102, p. 818–826.

Ramalho, V. C; Jorge, N. (2006) Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. *Revista Química Nova*, v. 24, p. 755-760.

Ranilla, L. G.; Kwon, Y.; Apostolidis, E.; Shetty, K. (2010) Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, v.101, 4676–4689.

Reifschneider, F. J. B. (Org.) (2000) *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil.* Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças.

Ribéreau-Gayon, P. (1968) Les Composés Phénoliques des Végétaux. Paris : Dunod, p. 254.

Rodriguez-Burruezo, A.; Gonzalez-Mas Mdel, C.; Nuez, F. (2010) Carotenoid composition and vitamin A value in aji (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (C.



pubescen R. & P.), 2 pepper species from the Andean region. *Journal of Food Science*. 75, S446–S453.

Rosa, A.; Delana, M.; Casu, V.; Paccagini, S.; Appendino, G.; Ballero, M.; Dessi, M. A. (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50. 7396-7401.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico – Embrapa 125.

Silva, L. R.; Azevedo, J.; Pereira, M. J.; Valentão, P.; Andrade, P. B. (2013) Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds. *Food and Chemical Toxicology* 53, 240–248.

Silva, D. J. F.; Scherer, B. S.; Alves, M. K.; Oliveira, J. R. (2009) Determinação do potencial antioxidante do extrato filtrado de *Capsicum baccatum* (pimenta dedo-de-moça) através do método DPPH. *X Salão de Iniciação Científica PUCRS*, Rio grande do Sul – PUCRS.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (2000) Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento. Universidade – UFRG, Ed. UFSC.

Simpson CF. (1978) Practical High Performance Liquid Chromatography. Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son.

Soares, S. E. (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*. 15:71-81.

Sousa, E. T.; Rodrigues, F. M.; Martins, C. C.; Oliveira, F. S.; Pereira, P. A. P.; Andrade, J. B. (2006) Multivariate optimization and HS-SPME/GC–MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. Peppers. *Microchemical Journal*, 82(2), 142–149.

Sousa, C. M. de M.; Silva, H. R.; Vieira, G. M. Jr.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. de M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. (2007) Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman.

Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem*, v. 30, p. 1190–1206.

Spiller, F.; Alves, M.K.; Vieira, S.M.; Carvalho, T.A.; Leite, C.E.; Lunardelli, A.; Poloni, J.A.; Cunha, F.Q.; Oliveira, J.R. (2008) Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, p. 473–478.

Soares, S.E. (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutrição* v.15, n.1. Campinas.

- Swain, T.; Hillis, W. E. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, v. 10, p. 63-68.
- Sucupiraa, N.R.; Silva, A.B.; Pereira, G.; Costa, J.N. (2012) Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 14(4):263-9.
- Sun, T., et al. (2007) Antioxidant activities of different colored sweet Bell peppers (*Capsicum annum* L.). *Journal Food Scienci*. 72.S98\_S102.
- Surh, Y.J.; Lee, E.; Lee, J.M. (2002) The Capsaicin Study. *Mutation Research*, v. 41, p. 259-267.
- Tait, A., Ganzerli, S.; Bella, M. (1996) Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-methylethyl) phenols. *Tetrahedron*, v. 52, p. 1287-12596.
- Talcott S.T.; Percival, S.S.; Pittet-Moore, J.; Celoria C. (2003) Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*passiflora edulis*). *J Agric Food Chem*, v.51, p.935-41.
- Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. K. D. (2004) The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacotherapy*, v.58, p.100-110.
- Tewksbury, J. J.; Nabhan, G. P. (2001) Diabetes Care. *Nature*, v.12, p.403-404.
- Toledo, M. C. F.; Esteves, W.; Hartmann, E. M.; (1985) *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.5, p.1.
- Tsakona, S., Galanakis, C.M., Gekas, V. (2012) Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food Bioprocess Technol.* v.5, p.1384–1393.
- Valentão, P. (2002) *Limonete, Hiperição do Gerês, Cardo-do-Coalho, Fel-da-Terra: Metodologia de controle de qualidade com base na fração fenólica e estudos da ação antioxidante e hepatoprotetora*. Tese (Doutorado em Farmácia) – Porto, Universidade do Porto.
- Vicentino A. R. R, Menezes F. S. (2007) Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.. 17, p. 384-387.
- Wahyuni, Y.; Ballester, A. R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R. J.; Bovy, A. G. (2011) Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, v. 72, p. 1358–1370.
- Yen, G. C.; Duh, P. D. (1994) Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, n. 3, p. 629-632.

Zhong, Y.; Shahidi, F. (2012) Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological systems. *Food Chemistry*, v. 131, p. 22–30.

Zimmer ,A. R.; Leonardia, B.; Mirona , D.; Schapovala, E.; Oliveira, J. R. de.; Gosmanna, G. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 228– 233.