

CAPSICUM BACCATUM VAR. PENDULUM: AÇÃO ANTIOXIDANTE
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA X ESTÁDIO DE MATURAÇÃO

MARIANA BARRETO DE SOUZA ARANTES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO- 2017

CAPSICUM BACCATUM VAR. PENDULUM: AÇÃO ANTIOXIDANTE
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA X ESTÁDIO DE MATURAÇÃO

MARIANA BARRETO DE SOUZA ARANTES

“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 Mestre em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO-2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

005/2017

A662 Arantes, Mariana Barreto de Souza.

Capsicum baccatum var. Pendulum : ação antioxidante e atividade antimicrobiana x estágio de maturação / Mariana Barreto de Souza Arantes – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

83 f. : il

Orientadora: Daniela Barros de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Bibliografia: f. 70 – 83.

1. Conservante Natural. 2. Capsicum Baccatum. 3. Extrato Bruto de Pimenta. 4. Atividade Antioxidante. 5. Atividade Antimicrobiana. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 635.643

CAPSICUM BACCATUM VAR. PENDULUM: AÇÃO ANTIOXIDANTE
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA X ESTÁDIO DE MATURAÇÃO

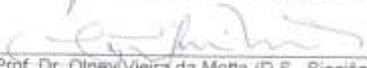
MARIANA BARRETO DE SOUZA ARANTES

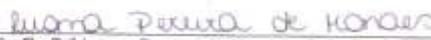
"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal."

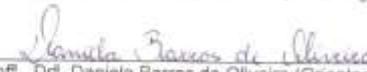
Aprovada em 27 de Março de 2017

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Lanamar de Almeida Carlos (D.S. Produção Vegetal) UFSJ- MG


Prof. Dr. Olney Vieira da Motta (D.S., Biotecnologia e Biotecnologia) UENF - RJ


Prof. Dr. Luana Pereira de Moraes (D.S., Engenharia de Alimentos) UENF - RJ


Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF - RJ

**"As monoculturas da mente fazem a
diversidade desaparecer da percepção"**

Vandana Shiva

Aos meus pais **Enos e Maria Helena**,
pelo incentivo de sempre na
busca por meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Rei do Universo Nosso Senhor, que todos os dias me cobre de bênçãos e forças para continuar a jornada.

À minha família, minha mãe Maria Helena, meu pai Enos, minha irmã Mayara, meus tios Ângela e Freire, minha avó Maria de Jesus (*in memoriam*) e a minha mascotinha pet Ester (que já não está entre nós). Obrigada sem vocês não seria nada. Agradeço todo carinho e afeto.

Ao meu namorado Marcelo, obrigada meu amor por tudo. Você sabe o quanto é importante a sua presença em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Daniela Barros de Oliveira, pela dedicação e confiança e ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço ao professor Olney Vieira da Motta por toda sua paciência e disponibilidade e também a professora Solange Samarão (LSA) que não mediu esforços em colaborar e auxiliar no trabalho microbiológico.

Agradeço a professora Rosana Rodrigues e as doutoras Cláudia Pombo e Cíntia Bento (LMGV) por doarem o material vegetal para estudo.

Agradeço as minhas grandes amigas do Laboratório 106 LTA: Silvia Pereira, Lorena Lima e Nathânia Mendes. Sem vocês nada teria conseguido. Obrigada pela amizade e parceria.

Aos amigos do Lab. de microbiologia do solo (LSOL) em especial a Andreia Ritter.

Agradeço a banca avaliadora prof Olney Vieira, prof. Luana Pereira e prof. Lanamar Carlos, que estão contribuindo muito para a finalização deste trabalho.

As minhas amigas de graduação, Waleska e Kíssila. Obrigada pelos momentos de descontração e amizade. Nunca me esquecerei de vocês, adoro a nossa amizade.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade de realizar meu sonho de conquistar o título de mestre em Produção Vegetal.

À CAPES, pelo apoio financeiro por meio de bolsa que também contribuiu para este trabalho.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que tudo isso fosse possível. Meus agradecimentos sinceros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Metabolismo primário X metabolismo secundário vegetal	4
3.2 Radicais livres x Substâncias antioxidantes.....	6
3.3 Substâncias antioxidantes	8
3.4 Grau de maturação dos frutos X Compostos antioxidantes.....	12
3.5 Classificação Botânica <i>Capsicum baccatum</i> var <i>pendulum</i>	13
3.6 Substâncias bioativas presentes no gênero <i>Capsicum</i>	15
3.7 Atividade antimicrobiana de extratos vegetais	18
3.8 Contaminação microbiana nos alimentos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Preparo dos extratos	24
4.2 Análises de teor de fenóis totais.....	25
4.2.1 Análise de dosagem de fenóis totais por Folin Ciocalteau	25

4.2.2	Análise de dosagem de fenóis totais por Fast Blue BB	25
4.5	Quantificação de ácido ascórbico.....	26
4.3	Análises da atividade antioxidante	26
4.3.1	Atividade antioxidante pelo método Método DPPH	26
4.3.2	Atividade Antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	27
4.4	Flavonoides Totais.....	28
4.5	Análise estatística.....	28
4.6	Avaliação do perfil químico por CLAE.....	28
4.7	Atividade antimicrobiana	30
4.7.1	Microrganismos.....	30
4.7.2	Preparo dos inóculos.....	30
4.7.3	Atividade antimicrobiana	31
4.7.4	Antibiograma	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
5.1.1	Teor de fenóis totais	33
5.1.2	Ácido ascórbico.....	36
5.1.3	Atividade antioxidante	38
5.1.4	Teor de flavonoides totais.....	45
5.1.5	Perfil químico por CLAE.....	46
5.2	Atividade antimicrobiana	55
5.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	55
5.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	56
5.2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	57
5.2.4	LSA 88	58
5.2.5	<i>Escherichia coli</i> ATCC (22922)	58
5.2.6	<i>Salmonella enterica</i> (ATCC 13076)	59
5.3	Avaliação do antibiograma.....	59
5.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	59
5.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	62
5.3.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228).....	63
5.3.4	LSA 88	65
5.3.5	<i>Salmonella enterica</i> (ATCC 13076)	66
6	RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre metabolismo primário e secundário.....	5
Figura 2: Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.....	7
Figura 3: Reação do radical livre DPPH com a substância antioxidante.....	8
Figura 4: Principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos.....	9
Figura 5: Principais classes de flavonóides.....	11
Figura 6: Detalhe da flor da pimenta Cambuci (<i>Capsicum baccatum</i>).Fonte: Arquivo pessoal).....	14
Figura 7: Estrutura fundamental da molécula de flavonoide.....	16
Figura 8: Ácido gálico.....	16
Figura 9: Molécula de capsaicina.....	17
Figura 10: Estruturas vitamina C, dos carotenóides α -caroteno e β -caroteno e da vitamina E.....	18
Figura 11: Acessos de pimenta da espécie <i>Capsicum baccatum</i> var <i>pendulum</i> em 2 estádios de maturação dos frutos (maduro e imaturo).....	24
Figura 12: Decaimento do teor de vitamina C em extratos de pimenta <i>C.baccatum</i> . A letra E é referente ao extrato. A letra F é referente ao fruto.....	38
Figura 13:Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante.....	41
Figura 14: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante.....	42

Figura 15:Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante.....	43
Figura 16: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante.....	44
Figura 17: Estrutura do ácido cinâmico.....	47
Figura 18: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliado em março de 2016.....	48
Figura 19: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliado em dezembro de 2016.....	49
Figura 20: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 M avaliado em março de 2016.....	50
Figura 21: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 M avaliado em dezembro de 2016.....	51
Figura 22: Perfil químico por CLAE da amostra 1613 V avaliado em março de 2016.....	51
Figura 23: Perfil químico por CLAE da amostra 1613 V avaliado em dezembro de 2016.....	52
Figura 24: Perfil químico por CLAE da amostra 1613 M avaliado em março de 2016.....	53
Figura 25: Perfil químico por CLAE da amostra 1613 M avaliado em dezembro de 2016.....	54
Figura 26: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliada em março de 2016 (1). Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliada em dezembro de 2016 (2).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição.....	29
Tabela 2: Tempo de retenção e comprimento de onda dos padrões.....	30
Tabela 3: Fenóis totais pelo método de Folin Cicateault presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	34
Tabela 4: Fenóis totais pelo método de Fast Blue BB presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	35
Tabela 5: Teores de ácido ascórbico presentes em frutos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	36
Tabela 6: Teores de ácido ascórbico presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	37
Tabela 7: Atividade antioxidante por FRAP presente em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	39
Tabela 8: Atividade antioxidante por DPPH presente em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	40
Tabela 9: Teor de flavonoides totais presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.....	45
Tabela 10: Tempo de retenção e comprimento de onda dos padrões.....	46
Tabela 11: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no teste antimicrobiano.....	55

Tabela 12: Antibiograma da cepa <i>S aureus</i> (25923) tratadas com extrato 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.....	60
Tabela 13: Resistência e sensibilidade de <i>S aureus</i> (25923) em relação aos tratamentos com extrato 1417 V de <i>Capsicum baccatum</i> e controle.....	62
Tabela 14: Antibiograma da cepa <i>S epidermidis</i> (12228) tratadas com extrato 1417 M, 1613 V, 1613 M, 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.....	63
Tabela 15: Resistência e sensibilidade <i>S epidermidis</i> (12228) em relação aos tratamentos com extratos de <i>Capsicum baccatum</i> e controle.....	65
Tabela 16: Antibiograma da cepa LSA 88 tratadas com extrato 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em Agar.....	66
Tabela 17: Antibiograma da cepa Salmonella entérica (ATCC 13076) tratadas com extrato 1417 M, 1613 V, 1613 M, 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.....	67

LISTA DE ABREVIACOES

ATCC - American Type Culture Collection

AMO- Amoxilina

AMC- Amoxilina/ cido clavulânico

BHT- Butil-hidroxi-tolueno

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLI- Clindamicina

CMI- Concentrao Mínima Inibitória

DPPH- 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

FRAP- Ferric Reducing Antioxidant Potential

GEN- Gentamicina

OXA- Oxacilina

PEN- Penicilina

VAM- Vancomicina

TET- Tetraciclina

RESUMO

ARANTES, M.B S. M.SC., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. *Capsicum baccatum* var. pendulum: Ação antioxidante e atividade antimicrobiana x estágio de maturação. Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira.

Os alimentos de maneira geral estão expostos a reações oxidativas que proporcionam a perda das características sensoriais como seu aroma, sabor e textura. Devido a este fator, a indústria de alimentos faz uso de conservantes sintéticos. No entanto, alguns estudos apontam para a ação cancerígena de muitos desses aditivos sintéticos utilizados para aumentar o tempo de prateleira dos produtos. Nesse sentido, é de interesse do setor de alimentos a busca por moléculas provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, possuam características de conservantes, ou seja, atuem como antioxidantes e antimicrobiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar as principais substâncias com ação de antioxidante e antimicrobiana de extratos de pimentas dos acessos UENF 1613 E UENF 1417 no estágio maduro e imaturo. Os frutos foram submetidos a refluxo em Soxhlet com etanol 70% (fruto:solvente, 1:10, p/v) por 4 horas a 90°C. Os extratos foram avaliados em dois estágios de maturação quanto ao teor de fenóis totais, ação antioxidante, vitamina C e flavonóides totais. O perfil químico dos extratos foi avaliado por CLAE com gradiente de eluição (água ultrapura acidificada e acetonitrila). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar e o teste de antimicrobiano foi realizado utilizando-se 10 discos de antibióticos. Os resultados revelaram que os extratos 1417 M e 1613

V apresentaram os maiores teores de fenóis totais para os métodos Folin Cicateault (163, 27 mg AG/100 g de extrato e 93,20 mg AG/100 g de extrato) e para Fast Blue BB (236,78 mg AG/100 g de extrato e 272,18 mg AG/100 g de extrato) respectivamente. Quanto a teor de ácido ascórbico, o fruto do acesso 1613 M apresentaram maiores teores de vitamina C (222,21 mg Vit C/ 100 g fruto) e os extratos 1417 M e 1613 M apresentaram os maiores teores (11,85 mg Vit C/ 100g de extrato e 9,36 mg Vit C/ 100g). A atividade antioxidante foi mais elevada para os extratos 1417 M e 1613 V (17,84 μ M sulfato ferroso /g de extrato e 31,38 μ M sulfato ferroso /g de extrato) segundo o método de FRAP. No método antioxidante de DPPH, os extratos 1417 M e 1613 V também apresentaram maiores atividades (86,61 % e 83,64 %) na concentração mais alta a 1000 μ g/mL. A relação entre o teor de fenóis totais e atividade antioxidante foi positiva. O extrato 1417 M apresentou o maior teor de flavonóides totais (10,44 mg de rutina/ g de extrato). O perfil químico por CLAE indicou a presença de ácidos fenólicos em todos os extratos avaliados, o que foi comparado pela injeção de padrões comerciais. O extrato 1417 V apresentou atividade antimicrobiana para os seguintes microorganismos: *S aureus* (ATCC 25923), *S aureus* (ATCC 33591), LSA 88, *S epidermidis* (ATCC 12228). Todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento de *S epidermidis* (ATCC 12228) e o extrato 1613 V teve ação antimicrobiana frente a *Salmonella enteridis* (ATCC 13096). Os extratos não tiveram efeito sob a *E coli* (ATCC 25922). Os testes de antibiograma, indicaram que houve sinergismo entre o extrato/disco de antibiótico entre todos os extratos que apresentaram efeito, exceto para a cepa *S aureus* 33591. O fator estágio de maturação dos frutos do extrato apresentou diferença para a avaliação das substâncias fenólicas, flavonóides, ácido ascórbico, atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados indicam que extratos de pimenta são promissores para o uso como conservante natural em substituição aos sintéticos frente aos microorganismos.

Palavras chaves: Conservante natural, extrato bruto

ABSTRACT

ARANTES, M.B S. M.SC., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March 2017. *Capsicum baccatum* var. Pendulum: Antioxidant action and antimicrobial activity x maturation stage. Advisor: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira.

Foods in general are exposed to oxidative reactions that lead to loss of sensory characteristics such as aroma, taste and texture. Due to this factor, the food industry makes use of synthetic preservatives. However, some studies point to the carcinogenic action of many of these synthetic additives used to increase the shelf life of products. In this sense, it is interest in the food sector to search for natural products that have characteristics of preservatives, that is, to act as antioxidants and antimicrobial. The objective of this work was to evaluate the main substances with antioxidant and antimicrobial action of extracts of peppers from fruits that were refluxed in Soxhlet with 70% ethanol (fruit: solvent, 1:10, w / v) for 4 hours at 90 ° C. The antioxidant agents were evaluated for total phenol content, antioxidant action, vitamin C and total flavonoids. The chemical profile of the extracts was evaluated by HPLC with elution gradient (acidified ultrapure water and acetonitrile). The antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion method and the antimicrobial test was carried out using 10 antibiotic disks. The results showed that extracts 1417 M and 1613 V presented the highest total phenol contents for Folin Cicateault (163. 27 mg AG / 100 g extract and 93.20 mg AG / 100 g extract) and for Fast Blue BB (236.78 mg AG / 100 g extract and 272.18 mg AG / 100 g extract) respectively. For to ascorbic acid content, the fruit from access

1613 M presented higher contents of vitamin C (222.21 mg Vit C / 100 g fruit) and extracts 1417 M and 1613 M presented the highest contents (11.85 mg Vit C / 100 g extract and 9.36 mg Vit C / 100g). The antioxidant activity was higher for the extracts 1417 M and 1613 V (17.84 μ M ferrous sulphate / g extract and 31.38 μ M ferrous sulphate / g extract) according to the FRAP method. In the antioxidant method of DPPH, 1417 M and 1613 V also had higher activities (86.61% and 83.64%) at the concentration evaluated at 1000 μ g / mL. The correlation between total phenol content and antioxidant activity was positive. The 1417 M extract had the highest total flavonoid content (10.44 mg rutin / g extract). The chemical profile by HPLC indicated the presence of phenolic acids in all extracts evaluated, which was evidenced by the injection of commercial standards. The extract 1417 V showed antimicrobial activity for the following microorganisms: *S aureus* (ATCC 25923), *S aureus* (ATCC 33591), LSA 88, *S epidermidis* (ATCC 12228). All extracts were able to inhibit the growth of *S epidermidis* (ATCC 12228) and extract 1613 V had antimicrobial action against *Salmonella enteridis* (ATCC 13096). The extracts had no effect under *E coli* (ATCC 25922). The antibiotic tests indicated that there was synergism between the extract - antibiotic disc among all the extracts that had effect, except for the strain *S aureus* 33591. The stage of maturation of the fruits of the extract had difference only for the evaluation of the phenolic substances, Flavonoids, ascorbic acid and antioxidant activity. The results indicate that pepper extracts are promising for use as a natural preservative instead of synthetic ones.

Key words: Natural preservative, crude extract

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos de maneira geral estão expostos a inúmeras reações, como as reações de oxidações lipídicas por ação do oxigênio e radicais livres que proporcionam a perda das características sensoriais como seu aroma, sabor e textura (Araújo, 2008).

Desta forma, a indústria de alimentos na tentativa de aumentar o tempo de prateleira de seus produtos utiliza substâncias sintéticas, tais como os antioxidantes BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona) que são bastante utilizados devido a sua ação inibitória nas reações de peroxidação lipídica (Araújo, 2008; Angelo et al, 2007; Soares, 2002).

No entanto, diversos autores vêm relatado efeitos deletérios no organismo humano devido ao consumo destes antioxidantes sintéticos (Castelo-Branco e Torres, 2011). Desta maneira, o cenário atual da indústria de alimentos busca a investigação para obtenção de antioxidantes oriundos de recursos naturais.

Muitas pesquisas relatam que os vegetais são as principais fontes de obtenção de antioxidantes naturais, em que, a partir de processos de extração com solventes específicos é possível obter um extrato com alto poder antioxidante, ou seja, com poder de sequestrar os radicais livres produzidos no meio devido a processos oxidativos (Bernardes et al, 2014; Bernardes, 2010, Soares, 2002).

Neste sentido, se faz necessária a pesquisa em torno de matrizes vegetais que possam atuar como agentes antioxidantes em substituição aos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria alimentícia. Também é importante ressaltar que muitas espécies vegetais, além de atuarem como antioxidantes possuem ação antimicrobiana, o que possibilita a sua utilização na indústria de alimentos como conservantes naturais.

A busca por agentes antimicrobianos que substituam a utilização de conservantes que atuam como inibidores de crescimento microbiano para a preservação de alimentos é de grande interesse da indústria de alimentos. Alguns estudos apontam o uso de extratos vegetais como alternativa para essa finalidade (Carlos et al, 2010; Carvalho et al, 2010; Carvalho et al, 2006). Há alguns relatos na literatura da relação entre as substâncias de origem vegetal com potencial antioxidante e antimicrobiano (Ahn et al, 2007; Taguri et al, 2006).

Neste contexto, espécies vegetais utilizadas como condimentos vêm se destacando, dentre elas o gênero *Capsicum* é de grande interesse entre os pesquisadores. *Capsicum baccatum* var. *pendulum* é amplamente consumida pela população brasileira. Dentro dessa espécie está incluída a pimenta popularmente conhecida como Chapéu de frade ou Cambuci, que foi objeto estudo desta dissertação (Carvalho e Biachetti, 2004).

As pimentas do gênero *Capsicum* vêm sendo utilizadas popularmente para fins condimentares, pois, proporcionam aos alimentos aroma e paladar agradável. Assim, é interessante a investigação de princípios ativos que possam vir a atuar como agentes antioxidantes e possam ser utilizados como método alternativo aos antioxidantes sintéticos.

O presente trabalho buscou avaliar os teores de algumas substâncias bioativas presentes em extratos de 2 acessos de pimentas originadas do banco de germoplasma da UENF em dois estádios de maturação (maduro e imaturo) e avaliar o potencial antimicrobiano de seus extratos sob cepas de alguns microrganismos encontrados em alimentos e que são relacionados a má higienização dos manipuladores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os teores de algumas substâncias bioativas responsáveis pela atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana de 2 acessos de pimentas (UENF 1417 e UENF 1613) em 2 estádios de maturação (verde e maduro) de *Capsicum baccatum* var. pendulum oriundas do banco de germoplasma da UENF.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o teor de fenóis totais pelos métodos de Folin Ciocalteu e Fast Blue BB;
- Avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP;
- Avaliar o teor de flavonóides totais
- Avaliar o teor de ácido ascórbico.
- Verificar o perfil químico dos extratos por CLAE.
- Avaliar a atividade antimicrobiana.
- Avaliar o sinergismo extrato-antibióticos comerciais pelo método do antibiograma.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metabolismo primário X metabolismo secundário vegetal

O organismo vegetal apresenta rotas de síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais das plantas. Essas rotas são denominadas de metabolismo primário vegetal. O metabolismo primário vegetal irá sintetizar estruturas, como parede celular (açúcares), membranas (lipídeos e proteínas) e material genético (proteínas) (Champe et al, 2009).

O metabolismo primário vegetal, está diretamente relacionado as vias de substâncias sintetizadas pelo metabolismo secundário vegetal (Figura 1). Um exemplo é a via de síntese de flavonoides que é originada a partir da via do ácido chiquímico e acetato via ácido mevalônico oriundas da biossíntese dos carboidratos (Champe et al, 2009).

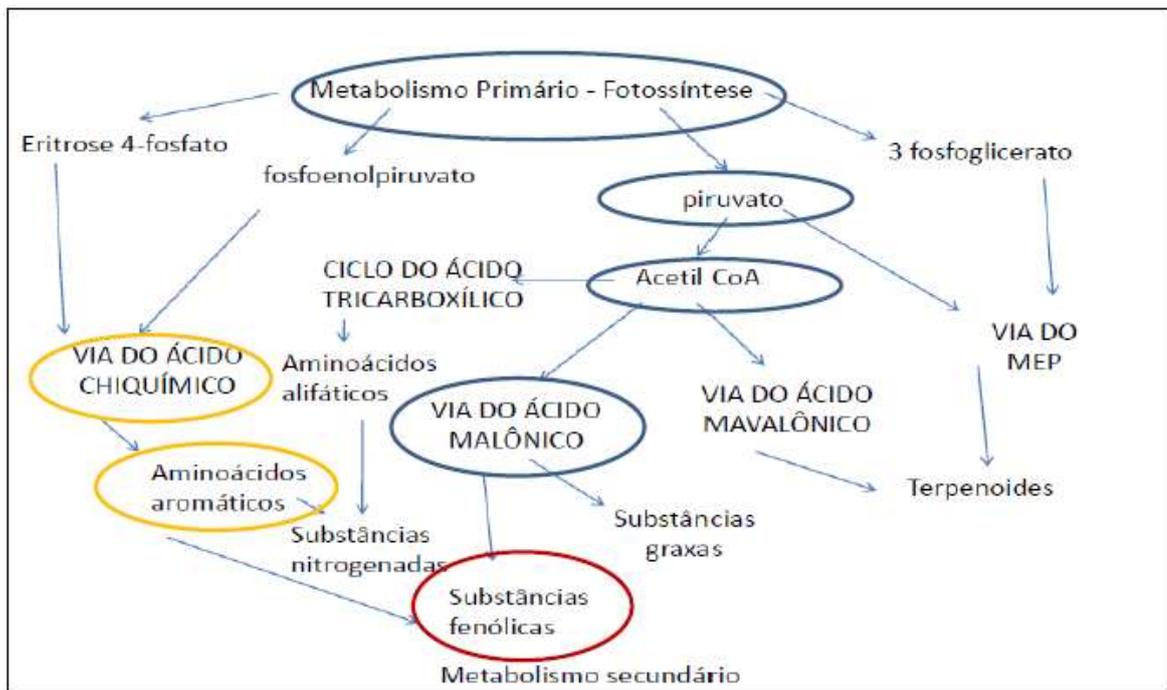


Figura 1: Relação entre metabolismo primário e secundário. Adaptado de Taiz e Lindoln, 2009.

Os vegetais produzem substâncias, originadas no metabolismo secundário, que são específicos de cada espécie e são produzidos em baixas concentrações pelas plantas. No entanto, essas moléculas são importantes para os vegetais devido a sua participação na atração de polinizadores, respostas químicas a estresse ambiental, defesas químicas contra microrganismos, insetos, outros predadores (Croteau et al., 2000). Os metabólitos secundários, geralmente, não possuem participação direta nos processos fotossintéticos, de translocação de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, síntese de carboidratos e lipídeos (Taiz e Lincoln, 2009).

O metabolismo secundário vegetal é composto de substâncias que possuem estrutura complexa, presente em baixas concentrações e possuem muitas atividades biológicas relacionadas como a ação anti-inflamatória, anticarcinogênica e antioxidante. Em relação aos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e podem ou não estarem presentes nas plantas, isso depende do ambiente onde estão inseridas (Berg e Lubert, 2008). Com base na origem metabólica, as substâncias oriundas de plantas podem ser divididos em três grupos majoritários, denominados terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (Croteau et al, 2000).

O presente trabalho foi concentrado no estudo das substâncias fenólicas, que são muito estudadas devido a suas atividades biológicas antioxidante, antifúngica, anticarcinogênica.

Os compostos fenólicos são biossintetizados por duas rotas principais: A rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico. A rota do ácido chiquímico funciona convertendo precursores de carboidratos (presentes na glicólise e via das pentoses) em aminoácidos aromáticos. Essa rota está presente em plantas, fungos, bactérias. A rota do ácido mevalônico é menos significativa para as plantas, sendo mais importante para fungos e bactérias (Taiz e Lincoln, 2009).

Os precursores das substâncias produzidas no metabolismo são provenientes de rotas primárias do metabolismo vegetal, conforme apresentado na figura 1 (Taiz e Lincoln, 2009).

Os compostos fenólicos apresentam estruturalmente anel aromático substituído por grupamento hidroxila. (Angelo, 2007). A classe de moléculas fenólicas pode ser agrupada em flavonoides (flavonas, isoflavonas e antocianinas) e substâncias não-flavonóides (ácidos fenólicos, taninos, cumarinas e tocofenóis) são descritos (Angelo et al, 2007; Soares, 2002).

Algumas propriedades tais como ação antioxidante e antimicrobiana são relatadas para o grupo dos compostos fenólicos, com destaque para a classe dos flavonóides e taninos (Zimmer et al, 2012; Kappel et al, 2008).

Em geral quando há ocorrência de atividade antioxidante, as moléculas possuem a capacidade de reagir (através da doação do hidrogênio ao elétron do radical livre e formar estruturas estáveis) por esse motivo são incluídos na categoria de antioxidantes naturais, devido a capacidade de sequestro dos radicais livres e a estabilidade do radical formado (Angelo et al, 2007, Soares, 2002).

3.2 Radicais livres x Substâncias antioxidantes

Os radicais livres são substâncias que apresentam um par de elétron desemparelhado e possuem alta instabilidade. Eles são formados por ação direta de fontes 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. Os radicais livres são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou

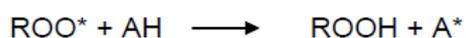
espécies reativas de nitrogênio (ERNs), pois, possuem elétron desemparelhado e centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio (Araújo, 2008).

Os radicais livres são promotores das reações de oxidações que promovem envelhecimento celular, além de ocasionarem danos ao DNA promovendo processos de mutagênese e carcinogênese. As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e de oxigênio (EROs) possuem alta reatividade com moléculas de lipídios, proteínas, DNA, vitaminas, carboidratos e outras biomoléculas essenciais para o funcionamento dos organismos (Shami e Moreira, 2004).

Uma reação frequentemente observada em alimentos quando há presença de radicais livres do meio é a peroxidação oxidativa, que consiste nas reações químicas envolvendo ácidos graxos insaturados e o grupo de oxigênio reativo.

As reações de peroxidação lipídica são divididas didaticamente em 3 fases: fase inicial, fase de propagação e fase terminal. O radical livre é gerado no meio devido a retirada de um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo insaturado. Posteriormente, o radical gerado no meio reage com oxigênio e forma o radical peroxil que atua em reações autocatalíticas que promovem reações com outras moléculas de ácidos graxos presentes no meio em questão (Soares, 2002).

As reações de peroxidação oxidativa oferecem produtos como aldeídos, cetonas, alcoóis e hidrocarbonetos que promovem alteração de propriedades organolépticas dos alimentos como cor, aroma e sabor. No entanto, o uso de antioxidantes evita as reações de peroxidação, que ocorre devido à presença de um elétron livre, que promove reações oxidativas. Porém, na presença de um antioxidante, a reação é inibida (Figura 2) e o alimento não sofre alterações (Bernardes et al, 2014; Araújo, 2008).



Onde: ROO* E R* são radicais livres; AH é o antioxidante com átomo de hidrogênio ativo e A* é o radical inerte;

Figura 2: Mecanismo de ação dos antioxidantes primários

As proteínas também são afetadas devido a ação de radicais livres formados no meio. Ocorrendo processos como fragmentação, modificação,

agregação e ativação ou inativação de enzimas pela reação das proteínas com os radicais. O DNA também é afetado devido a presença de radicais livres no meio, ocorre alterações cromossômicas como mutação, deleção, inversão, translocação que comprometem as moléculas de DNA quanto ao funcionamento (Soares, 2002).

Desta forma, as substâncias sintetizadas no metabolismo secundário vegetal podem estar atuando como antioxidantes naturais, promovendo a estabilidade do radical livre formado no meio. Como ocorre em ensaios utilizando extratos vegetais e o radical livre sintético DPPH (figura 3) (Araújo, 2008; Toledo et al, 1985).

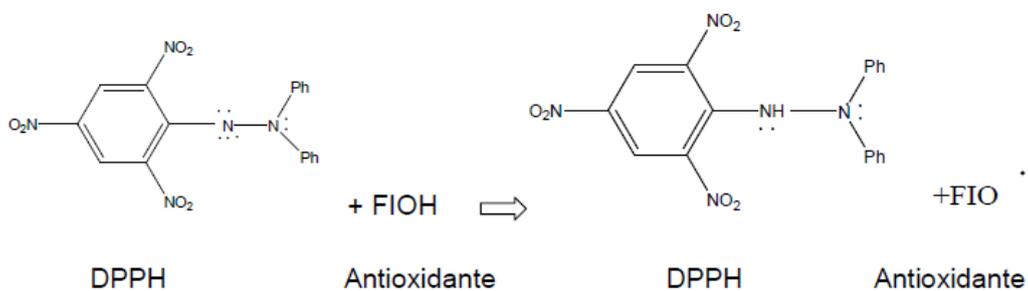


Figura 3: Reação do radical livre DPPH com a substância antioxidante. (Amié, 2003).

3.3 Substâncias antioxidantes

O retardo da peroxidação oxidativa pela ação de radicais livres foi relatado pela primeira vez em 1797 por Berthollet e em 1817 por Duclaux nesta ocasião houve a explicação da ação do oxigênio atmosférico como um dos maiores promotores de reações de oxidação de ácidos graxos insaturados. Wright, em 1852, observou que índios americanos do Vale de Ohio preservavam gordura de urso usando casca de omeiro (*Ulmus L*). Essa forma de conservação foi patenteada como antioxidante 30 anos mais tarde (Ramalho *et al*, 2006)

As reações promovidas por radicais livres podem ser evitados ou amenizadas com o uso de substâncias antioxidantes, que impedem a formação de espécies reativas (radicais livres) e assim proporcionam a integridade das substâncias presentes no meio por mais tempo (Soares, 2002).

Em relação ao organismo humano, à ingestão de alimentos com potencial antioxidante auxiliam na prevenção a oxidação proveniente dos processos biológicos oriundos de fatores exógenos ao organismo como a

poluição ambiental e gases de escapamentos de veículos; raios X e radiação ultravioleta do sol; fumo e fumaça de cigarro e o álcool; resíduos de defensivos agrícolas; substâncias tóxicas presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, aflatoxinas) stress e alto consumo de gorduras saturadas por exemplo (Degáspari et al , 2004).

Já fatores endógenos de formação dos radicais livres no organismo humano como envelhecimento celular, câncer e doenças degenerativas podem ser reduzidos com o consumo e dieta diária de alimentos com potencial antioxidante (Degáspari et. al, 2004).

Em relação aos alimentos, os antioxidantes promovem um aumento do tempo de prateleira. Visto que, moléculas de ácidos graxos, vitaminas, proteínas e carboidratos não serão degradados tão facilmente (Broinizi et al, 2007).

A indústria alimentícia desde os anos 1980 vêm aplicando em seus produtos substâncias antioxidantes sintéticas como os seguintes polifenóis: BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona) que são os mais utilizados na indústria de alimentos (figura 4).

No entanto, segundo Broinizi e colaboradores em 2007, alguns estudos relatam que antioxidantes sintéticos utilizados na indústria podem estar ligados a efeitos como deletérios ao organismo quando consumidos regularmente.

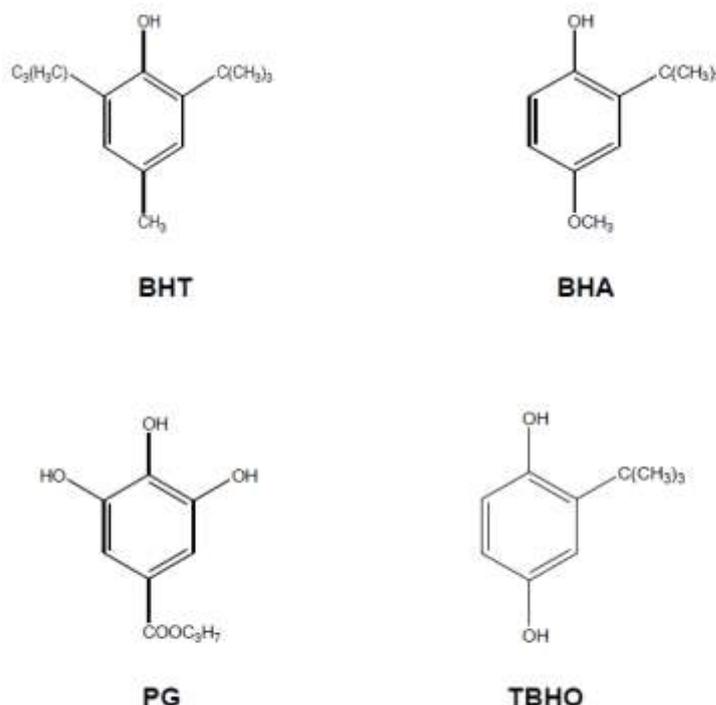


Figura 4: Principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos.

Desta forma, se faz importante a pesquisa em torno de antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais. As matrizes vegetais são as principais fontes de compostos antioxidantes. Dentre as substâncias químicas presentes nos vegetais são relatados na literatura o ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides, tocofenóis (vitamina E) que são pertencentes ao grupo de compostos fenólicos, entre outras.

Os compostos fenólicos provenientes de fontes vegetais possuem bom potencial antioxidante, pois, eles atuam na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais, agindo na etapa de iniciação e na etapa de propagação da peroxidação lipídica. Esses compostos apresentam grupo aromático benzênico que devido à ressonância do anel são estabilizados (Degáspari et al, 2004; Soares 2002).

Os compostos fenólicos são divididos entre não flavonóides (ácidos fenólicos em geral) e flavonoides, sendo este último dividido em 6 classes (figura 5) que são: flavonóis, flavonas, flavanóis, antocianidina, flavanonas e isoflavonas (Ribani, 2006).

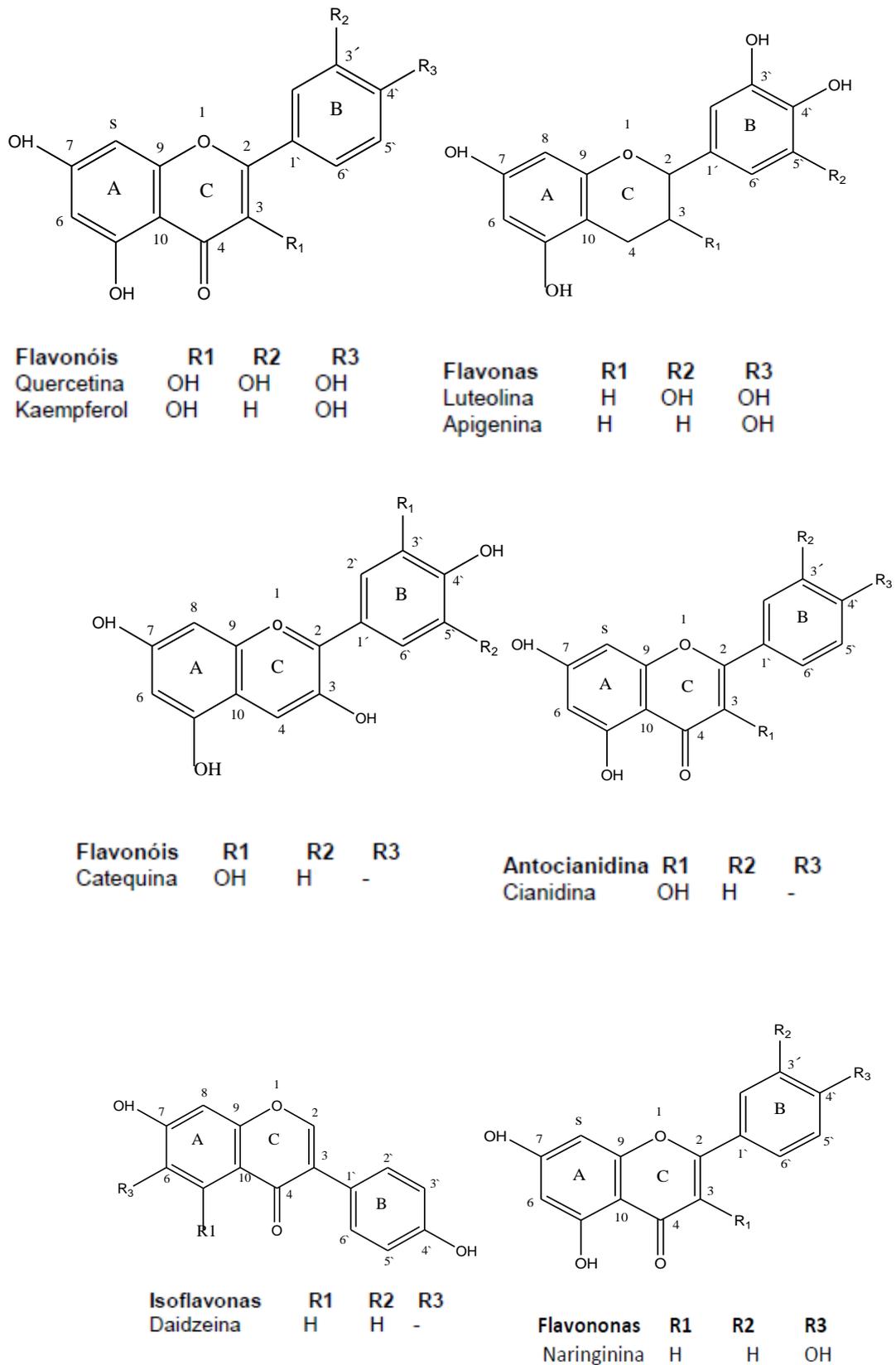


Figura 5: Principais classes de flavonóides

Algumas dificuldades são observadas em relação a utilização dos extratos vegetais, como a própria obtenção de bioativos que requerem uma grande massa

de material vegetal como ocorre com a planta *Impatiens walleriana* (popularmente maria-sem-vergonha ou beijo de frade) que necessita de 1 tonelada de material vegetal para a extração de 1 g da substância com atividade relatada como antitumoral (Ding et al, 2008; Oku & Ishiguro 2001).

A instabilidade em alguns extratos também pode ser questionada em relação a sua utilização, pois, o ambiente em que o vegetal se encontra é fator determinante na obtenção do teor do isolado químico ativo. O ambiente de cultivo ou local de realização do extrativismo do vegetal é de grande importância para a produção de metabólitos secundários, pois em determinados ambientes e períodos do ano pode ocorrer a queda ou ausência da molécula bioativa de interesse (Neves et al, 2006).

Entre as metodologias utilizadas para a avaliação *in vitro* de antioxidantes há destaque para o método fotolorimétrico do radical sintético estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), em que atividade sequestradora de radicais livres do meio é expressa pela relação da absorção do radical DPPH, baseado na solução de DPPH (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática, BHT (2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol) que é o controle positivo da análise. Após a reação é realizado o cálculo do sequestro de radicais livres DPPH pelo extrato vegetal utilizado no experimento (Koleva et al, 2002).

3.4 Grau de maturação dos frutos X Compostos antioxidantes

Condições diferenciadas no ambiente, cultivo e manejo e as inerentes ao material vegetal podem alterar a composição e os teores de substâncias bioativas. Vários autores relatam que de acordo com a espécie, genótipo e grau de maturação das pimentas essas podem sofrer variações quanto ao perfil químico dos extratos (Ogiso et al, 2008; Davis et al, 2007).

Segundo Carvalho e colaboradores em 2014, o grau de maturação influenciou no teor de moléculas bioativas dos genótipos de pimentas do gênero *Capsicum* avaliadas, pois, os frutos imaturos continham maiores teores de ácido ascórbico e compostos fenólicos, e frutos maduros apresentaram maiores teores de carotenoides totais que os frutos imaturos.

A partir de estudos realizados por Menichini et al (2009), com pimentas *C. chinense*, foram observados maior atividade antioxidante para os frutos no estágio de maturação verde, ao contrário dos frutos totalmente maduros.

No entanto, segundo Howard et al. (2000), ao avaliar estruturas fenólicas em pimentas *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, por Folin-Ciocalteu e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi observado que os teores de compostos bioativos aumentaram com a maturação, independentemente do método de determinação aplicado.

Em estudos realizados por Conforti et al (2007) comparando 3 estádios de maturação (fruto vermelho, fruto verde grande e fruto verde pequeno) da espécie *C. annuum L. var. acuminatum* preparados a partir de extração metanólica. Os autores obtiveram como resultado para análises realizadas utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu (que avalia o teor total de compostos fenólicos) os seguintes resultados: Para estágio de maturação de frutos verdes pequenos o teor de fenóis totais foi 76,0 mg / g, para frutos verdes grande foi de 73,8 mg / g. Enquanto que para frutas totalmente maduras (frutos vermelhos) foi de 43,2 mg / g de fenóis totais.

Conforti et al. (2007) avaliou ainda a atividade antioxidante dos frutos de extratos metanólicos da espécie *C. annuum L. var. acuminatum* nesses 3 estádios de maturação. A avaliação foi realizada utilizando o método do DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), os resultados obtidos revelaram que o fruto verde pequeno revelou a melhor atividade antioxidante quando comparado aos frutos vermelho e fruto verde grande, que mantiveram suas atividades semelhantes.

Investigações a respeito do potencial antioxidante dos frutos de *C. baccatum* são interessantes devido ao grande consumo desta hortaliça que é a terceira mais consumida no Brasil (Ribeiro et al, 2008).

3.5 Classificação Botânica *Capsicum baccatum* var *pendulum*

A espécie *Capsicum baccatum* pertence a família das Solanaceae e gênero *Capsicum* são nativas das regiões tropicais e temperadas da América., e possui como centro de origem a Bolívia (Castro et al, 2011).

A família Solanaceae representa uma fonte básica da alimentação humana. No Brasil, a família possui ocorrência de 34 gêneros e 449 espécies (Stehmann et al, 2010). Pertencem a essa família botânica o tomate (*S.*

lycopersicum L.), batata (*Solanum tuberosum* L.) e o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que são culturas de grande importância econômica.

Atualmente são descritos cerca de 35 espécies de pimentas dentro do gênero *Capsicum*, 5 delas são domesticadas e amplamente exploradas pela agricultura *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens* as demais pimentas são silvestres (Carrizo et al, 2013).

A espécie *Capsicum baccatum* compreende duas variedades botânicas: *C. baccatum* var. *baccatum* (Cumari) e *C. baccatum* var. *pendulum*. Sendo, a espécie *C. baccatum* var. *pendulum* chamadas de pimentas chapéu de frade ou Cambuci e dedo de moça (nomes populares) as mais consumidas no Brasil (Embrapa Hortaliças, 2015; Carvalho e Biachetti, 2004).

Em relação a botânica sistemática, a espécie *C. baccatum* possui cor da corola branca e sempre apresentam um par de manchas amareladas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas, as anteras são amareladas (Figura 6). As flores são hermafroditas e autógamas, ou seja, antes da antese há a autofecundação. Os frutos são do tipo baga e quando maduros são desde alaranjados até avermelhados, quando imaturos são verdes. Quanto ao formato os frutos podem ser alongados, arredondados e campanulados. (Embrapa Hortaliças, 2015).



Figura 6: Detalhe da flor da pimenta Cambuci (*Capsicum baccatum*).Fonte: Arquivo pessoal.

3.6 Substâncias bioativas presentes no gênero *Capsicum*

Os vegetais do gênero *Capsicum* possuem moléculas com bioatividade como os capsaicinoides (responsável pela pungência das pimentas) e substâncias antioxidantes como a vitamina E, vitamina C e carotenoides (Carvalho e Biachetti, 2004).

As pimentas do gênero *Capsicum* tem em geral alta biossíntese de oleorresinas e de capsaicinoides. Os capsaicinoides são naturalmente produzidos nas células epidérmicas da placenta dos frutos, proporcionam nas bagas das pimentas a pungência, característica que possibilita o amplo uso para as finalidades humanas, entre as quais está o uso condimentar, o repelente e como medicinal (Carvalho e Biachetti, 2004).

As pimentas do gênero *Capsicum*, possuem uso popular medicinal relatado em todo país. Diversas pimentas vêm sendo utilizadas popularmente para combater micoses de pele, alívio de cólicas menstruais, uso no tratamento de feridas e furúnculos, coceiras, vermes e reumatismo (Silva, 2012; Berg, 1988).

O autor Kappel e colaboradores (2008) por exemplo, relata em experimentos realizados a partir de *Capsicum baccatum* dosagem do teor de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu. Neste experimento foram avaliadas as seguintes partes do vegetal (pericarpo, placenta e sementes) de frutos verdes e maduros. Os resultados indicaram que o teor mais elevado de fenóis totais foi para placenta imatura e semente madura quando comparado com as outras partes. O mesmo autor em experimento para avaliação antioxidante relata nos resultados que tanto os extratos de partes do fruto maduro quanto do imaturo (verde) apresentam atividade antioxidante.

Zimmer e colaboradores (2012), avaliaram teores de fenóis totais e a atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em frutos e sementes de *C. baccatum* e correlacionou a atividade antioxidante com a alta concentração de fenóis oriundas dos extratos testados. Foi observado que os frutos de *C. baccatum* apresentaram maiores teores de flavonoides e compostos fenólicos do que as sementes.

As atividades antioxidantes e anti-inflamatórias vêm sendo relatadas por diversos autores (Hervert-Hernandez et al, 2010; Costa et al, 2009). Tais

propriedades estão intimamente ligadas aos altos teores de capsaicínoides e compostos fenólicos presentes nos frutos de pimentas do gênero *Capsicum*.

Um dos compostos fenólicos mais investigados na literatura é pertencente a classe dos flavonóides (figura 7). Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes nos vegetais, sua biossíntese ocorre nas vias do metabolismo secundário dos vegetais. São substâncias que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou seus derivados funcionais (Harborne, 1994).

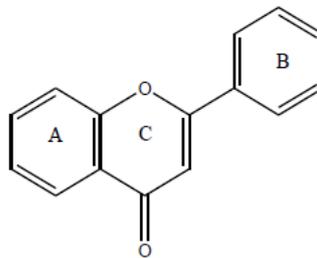


Figura 7: Estrutura fundamental da molécula de flavonoide

Entre os compostos não-flavonoides, os mais avaliados são pertencentes a classe dos taninos, que são divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico (figura 8) elágico glicosilado, formado a partir do chiquimato. O ácido gálico que é um monômero de tanino hidrolisável. Os taninos condensados são formados pela polimerização de alguns flavonoides (Taiz e Lincoln, 2009; Angelo e Jorge, 2007). Os taninos possuem em geral atividade contra a herbivoria e também já são relatadas atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (Monteiro et al, 2005).

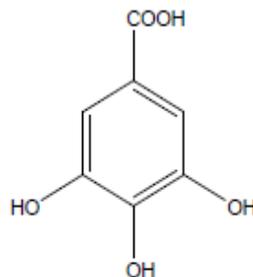


Figura 8: Ácido gálico

Alguns ácidos fenólicos foram identificados e quantificados nos acessos 1613 e 1417 no estágio maduro. Entre eles se destacam o ácido clorogênico, ácido cafeico (Assis, 2014). No entanto, é a primeira vez que esses acessos são avaliados no estágio imaturo de maturação dos frutos.

Os capsaicínides são os responsáveis pela pungência e são observados na placenta dos frutos de pimenta. Quimicamente falando são amidas de vanilamina (4-hidróxi-3-metóxi-benzilamina) e ácidos saturados ou insaturados. Sendo a capsaicina {N-[(4- hidróxi-3-metóxi-fenil)metil]-8metilnon-6-enamida} (Figura 9) a molécula mais descrita na literatura (Carvalho et al, 1999).

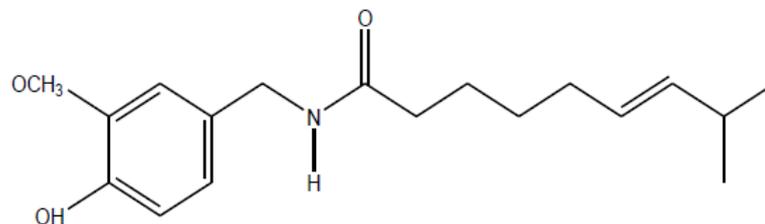
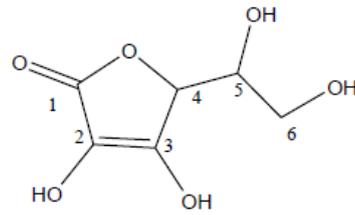


Figura 9: Molécula de capsaicina

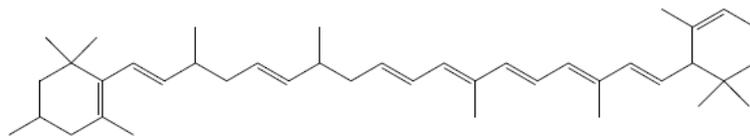
O amadurecimento dos frutos está diretamente ligado ao teor de pungência, quanto mais maduro o fruto maiores teores de capsaicina. A capsaicina possui atividade antioxidante e antiinflamatória descritas na literatura. (Tewksbury e Nabhan, 2001).

Outros compostos com atividade antioxidante natural como ácido ascórbico (vitamina C), precursores da vitamina A (carotenoides) e vitamina E (tocoferol) (Figura 10) também são encontrados em pimentas do gênero *Capsicum* (Surh et al, 2002).

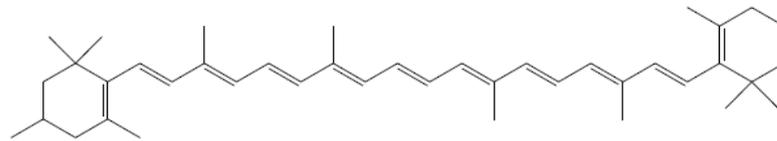
Dentre a gama de compostos extraídos dos frutos e sementes de pimenta do gênero *Capsicum*, pode-se dizer que os capsaicina (figura 9) constitui um dos principais compostos da classe dos capsaicínides. Os compostos majoritários em pimentas desta espécie são os carotenóides, das vitaminas (A, E e C), compostos fenólicos, que apesar de minoritários possuem grande importância como antioxidantes naturais e capsaicínides (Carvalho et al, 1999).



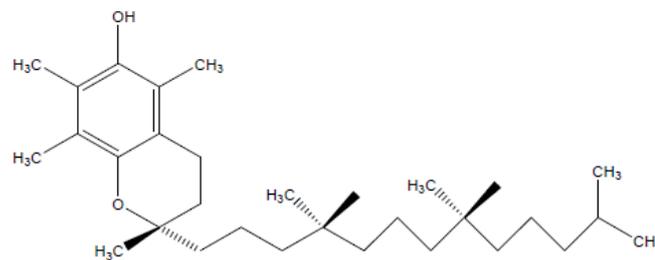
Ácido ascórbico (vitamina C)



α -caroteno



β -caroteno



Tocoferol (Vitamina E)

Figura 10: Estruturas Vitamina C, dos carotenoides α -caroteno e β -caroteno e da Vitamina E.

3.7 Atividade antimicrobiana de extratos vegetais

A resistência microbiana é atualmente um grande problema na cadeia de produção de alimentos e na área de saúde visto que, ela limita a utilização de produtos como conservantes sintéticos, no caso da indústria de alimentos, agroquímicos (para o cultivo de alimentos em geral) e de antifúngicos e antibióticos, no caso da indústria farmacêutica. Desta maneira, extratos e isolados vegetais surgem como nova possibilidade para ação antimicrobiana (Lima et al, 2006).

A investigação do potencial antimicrobiano de alguns extratos vegetais é mencionada por pesquisadores (Carvalho et al, 2010; Wiest et al, 2009) que utilizam esses extratos para a inibição do desenvolvimento de colônias de fungos e bactérias fitopatológicas e de interesse na medicina.

Pereira 2015, ao investigar peptídeos antimicrobianos em extratos etanólicos de *C. annuum* L. inibiram o crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* que causam a antracnose e da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* que causa a mancha bactéria em plantas.

Em ensaios realizados com extratos das espécies *C. frutescens*, *C. annuum* e *C. baccatum* e linhagens bacterianas de *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. A pimenta *C. frutescens* apresentou a melhor eficácia antibacteriana (Carvalho et al, 2010).

Nos experimentos de Santos, 2010 não foi observada a inibição de *E. coli* por parte do extrato de *C. annuum* L, no entanto, para o fungo *Candida albicans* houve inibição significativa do seu crescimento microbiano. Em extratos da espécie *Capsicum frutescens*, foi observada inibição de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* (Barbosa, 2012).

O uso de extratos vegetais com potencial de ação antimicrobiana é interessante, pois, há relatos de frequentes quebras de resistência e alguns efeitos colaterais que os produtos sintéticos ocasionam (Ravishankar et al, 2012). Desta forma, alguns estudos vêm sendo realizados principalmente com a bactéria do gênero *Staphylococcus* que ocasiona infecções hospitalares e intoxicações alimentares (Carlos et al, 2010; Carvalho et al, 2010).

Com a finalidade de preservar os alimentos dos microrganismos que causam as intoxicações alimentares, Carvalho et al (2006) demonstraram que bactérias toxinfetivas alimentares podem sofrer inibição pela presença de extratos vegetais de condimentos que atuam como conservantes em alimentos.

O uso de conservantes tem a função de atuar como proteção aos alimentos em razão da proliferação de microrganismos. No entanto, o mercado busca a substituição destes conservantes sintéticos devido às exigências dos consumidores. Além disso, estudos demonstraram que produtos sintéticos utilizados para inibir ou eliminar o desenvolvimento de micro-organismos, são limitados devido a resistência adquirida pelos microrganismos. Neste sentido, extratos vegetais vêm sendo amplamente trabalhados em ensaios que investiguem o seu potencial antimicrobiano. (Cruz-Galvez et al, 2013).

3.8 Contaminação microbiana nos alimentos

De maneira geral os alimentos estão expostos a todo tipo de contaminação microbiana. A contaminação pode ser oriunda do próprio ambiente onde o alimento é preparado ou obtido (caso de alimentos agrícolas), manipuladores, embalagens contaminadas devido a forma inadequada de realizar métodos de conservação (Fu et al, 2016; Forsythe, 2013).

Atualmente, a contaminação microbiana é dividida em várias categorias sendo as mais importantes classificadas em contaminação patogênica e não patogênica (deterioração). Microorganismos patogênicos tem relação com grandes surtos e geralmente acometem grandes lotes do alimento comercializado. As bactérias mais comuns em grandes surtos são: *E coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* *Salmonella* spp (Fu et al, 2016).

Staphylococcus aureus é uma bactéria do tipo coco gram - positiva. Esse microrganismo é encontrado com frequência na pele e na cavidade nasal de pessoas saudáveis e na cadeia produtiva de matrizes alimentícias, está ligada a má manipulação dos produtos. A bactéria é capaz de resistir à situação ambiental de desidratação e congelamento. Atualmente, *S. aureus* tem mostrado resistência a maioria dos antibióticos comerciais desta forma, surge a necessidade de busca por novas substâncias inibidoras do crescimento bacteriano (Santos, 2007).

Na literatura é possível encontrar relatos dos problemas causados pela contaminação de bactérias patogênicas em alimentos. Autores como Solano et al (2013) relatam que a bactéria *Staphylococcus aureus* foi responsável pela hospitalização de crianças em um clube de Barcelona e que o alimento servido no local era a fonte da intoxicação alimentar. No Brasil em Pelotas, pesquisadores isolaram *Listeria monocytogenes* de lingüiça frescal, onde o trabalho revelou que a contaminação ocorreu no durante o processamento do produto final, visto que, o microrganismo em questão não foi encontrado na matéria prima e sim no ambiente e manipulação durante o processo (Laer et al, 2009).

A deterioração dos alimentos pode ocorrer devido a reações de escurecimento enzimático, lesões provenientes do transporte, desenvolvimento de fungos e ação de pragas no pós colheita. No entanto, a ação de bactérias na deterioração de alimentos é um dos maiores fatores na redução do tempo de

prateleira dos produtos, sendo as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp a mais observada durante o processo (Fu et al, 2016; Lou et al, 2014).

É possível observar que os alimentos em pleno processo de deterioração podem apresentar perda de cor, formação de limo e ranço, cheirar ácido à medida que se desenvolvem em outra fase de fermentação (caso de produtos lácteos), formação de manchas de bactérias e amolecimento do produto (em verduras) causando grande impacto negativo no mercado financeiro de produtos agroindustriais (Fu et al, 2016; Forsythe, 2013).

Portanto, devido aos processos de deterioração a indústria de alimentos utiliza conservantes que possuam ação de inibir o crescimento microbiano. Desta forma, a busca por produtos naturais que possuam ação semelhante aos sintéticos é de grande interesse.

Os aditivos utilizados pela indústria de alimentos para aumentar o tempo de prateleira de seus produtos tem sido questionado pelos consumidores (Polônio et al, 2009). Do ponto de vista da lei, um aditivo é inserido a um alimento para proporcionar alterações nas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante todo processo produtivo e enquanto o alimento estiver exposto para comercialização (Brasil, 2007).

Ocorre que muitas substâncias utilizadas como conservantes são relatadas como cancerígenas. O que pode ter despertado o interesse para investigações promissoras a respeito de extratos de plantas que possam atuar reduzindo a ação de microorganismos e reações possam degradar os alimentos (Broinizi et al, 2007).

Desta forma, a população consumidora se torna mais atraída por um alimento produzido com inserção de conservantes naturais o que agrega valor comercial ao produto e bem estar aos consumidores (Pereira et al, 2006).

Vários trabalhos têm sido publicados com finalidade de divulgar o potencial conservante de vários extratos vegetais. Em um estudo com 32 plantas condimentares utilizadas popularmente, 12 apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* (Carvalho et al, 2005). É importante destacar que pimentas do gênero *Capsicum* apresentam promissora capacidade de conservar os alimentos. Visto que, atividade antimicrobiana e antioxidante tem sido relatadas (Kappel et al, 2008; Conforti et al, 2007; Cruz et al, 2003).

Desta maneira, estudo com a finalidade de confirmar a potencialidade da utilização de extratos vegetais como condimentos encontram espaço no campo científico, e faz com que pesquisas relacionadas a investigação de matrizes vegetais sejam de grande importância.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os Genótipos UENF-1417 e UENF-1613 (Figura 11) foram obtidos do banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense, sob supervisão da professora Dra. Rosana Rodrigues. A adubação e os demais tratamentos culturais foram realizados conforme as recomendações para a cultura (Filgueira, 2008). O material vegetal foi depositado no herbário da universidade sob o número de tombo HUENF 9607.

A semeadura foi realizada em fevereiro de 2015. Os frutos verdes foram colhidos aproximadamente aos 100 dias após a semeadura (abril de 2015) e o fruto maduro após 160 dias após a semeadura (junho de 2015).



Figura 11: Acessos de pimentas da espécie *Capsicum baccatum* var *pendulum* em 2 estádios de maturação dos frutos (maduro e imaturo).

4.1 Preparo dos extratos

O método de extração utilizado foi adaptado da metodologia de Zimmer et al (2012), com extração 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.

Os extratos foram produzidos em setembro de 2015 e as análises realizadas entre março e abril de 2016 para Folin Ciocalteau, Fast Blue BB, Vitamina C, DPPH, FRAP e flavonóides totais. O perfil químico por CLAE foi avaliado em março de 2016 e dezembro de 2016. A avaliação antimicrobiana foi realizada entre março- dezembro 2016 e o teste do antibiograma entre dezembro 2016 e janeiro de 2017.

Os frutos foram cortados para retirar as sementes, e a seguir lavados com água corrente. Em seguida, pesados e após levados à estufa de circulação de ar a 40 °C e retirados da mesma quando atingirem uma massa constante.

O solvente utilizado na preparação do extrato foi o etanol. Os frutos após a secagem, foram triturados e submetidos a extração em Soxhlet com etanol 70 % (Fruto: Solvente- 1:10 p/v) por 4 horas.

O rendimento dos extratos foi calculado subtraindo-se a massa seca do material pelo extrato obtido ao fim da extração.

Os extratos foram evaporados por rota evaporador a 79°C e então foram obtidos extratos com os respectivos rendimentos: 21% (1417 verde), 31% (1613 verde), 17,96% (1417 maduro) e 14,64% (1613 maduro).

4.2 Análises de teor de fenóis totais

4.2.1 Análise de dosagem de fenóis totais por Folin Ciocalteu

Os extratos foram preparados na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Foram retirados 30 µL dessas amostras e transferidas para placa de 96 poços. Em seguida foram adicionados 50 µL do reagente de Folin- Ciocalteu (1 N) e acrescentados 100 µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7,5% após 10 min. A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm após 2 h de incubação à temperatura ambiente (AOAC,

A curva padrão foi construída com ácido gálico, em concentrações que variavam de 5,0 a 500 µg/mL (Equação 1). 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 o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) (Zimmer, et al; 2012).

$$Y = 0,0037x + 0,0918 \quad R^2 = 0,986 \quad \text{Equação 1}$$

4.2.2 Análise de dosagem de fenóis totais por Fast Blue BB

O método para dosagens de fenóis totais de Fast Blue BB se baseia na interação direta entre polifenóis com o sal de diazônio Fast Blue BB, resultando em uma substituição eletrofílica aromática e, em relação ao método de Folin-Ciocalteu tem a vantagem da ausência de interferências com ácido ascórbico e outros compostos redutores (Lester et al, 2012).

Para aplicação da metodologia foi utilizado 4 mL de solução padrão e amostra em tubos boro-silicatados, adicionados a 0,4 mL de Fast Blue BB 0,01% (p:v), onde foi agitado durante um minuto em vortex, e adicionado em seguida 0,4

mL de NaOH a 5% (p:v). Após a amostra com os reagentes permaneceu em repouso em temperatura ambiente durante 1 hora e trinta minutos, sendo novamente agitado, um minuto antes de medir a absorbância a 420 nm em espectrofotômetro UV/Vis e anteriormente foi realizada a leitura de um branco. O padrão utilizado para a confecção da curva padrão foi o ácido gálico nas concentrações de 0 a 250 mg.L⁻¹ (Equação 2). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico para cada 100 g de amostra.

$$Y=0,0022x - 0,035 \quad R^2= 0,989 \quad \text{Equação 2}$$

4.5 Quantificação de ácido ascórbico

Os teores de ácido L-ascórbico foram determinados por meio de titulação com 2,6 dicloroindofenol e utilizando o ácido oxálico a 1%. Este método é baseado na redução do 2,6-dicloroindofenol (2,6D), de cor roxa, pelo ácido L-ascórbico em meio ácido, tornando-se incolor. O ponto final de titulação foi verificado quando todo o ácido ascórbico presente for oxidado e a solução 2,6 D, não reduzida, confere coloração rosada à solução.

O mesmo procedimento foi repetido para o ensaio em branco, substituindo a solução padrão de vitamina C, por água destilada. O valor médio das titulações com solução padrão, subtraído do branco foi o título da solução 2,6 D. O resultado foi expresso em mg/100g de amostra para a fruta *in natura* (Nogueira et al, 2002). Foram realizadas análises de vitamina C para o fruto fresco e extrato de ácido ascórbico.

4.3 Análises da atividade antioxidante

4.3.1 Atividade antioxidante pelo método Método DPPH

Os extratos dos genótipos UENF-1417 e UENF-1613 foram avaliados quanto a atividade antioxidante pelo método do DPPH, radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, constitui um método fotolorimétrico.

Neste método foi avaliada a capacidade dos extratos em seqüestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). As substâncias antioxidantes presentes nas amostras reagem com o DPPH, que é um radical estável, são convertidas em 2,2- difenil-1-picril-hidrazina. A reação é

acompanhada pela perda de cor, a solução violeta se torna amarela clara se houver capacidade antioxidante do extrato (Ali et al, 2009; Amié et al, 2003).

O método consistiu na adição de 1 mL do extrato em concentrações que variou de 0,1 - 1000 µg/mL, em 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), sendo a reação processada em 1h à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi realizada em 515 nm com o uso do equipamento espectrofotômetro UV-Vis. A atividade de sequestro dos radicais livres de cada amostra 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) (Yen e Duh, 1994), presente na equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = ((ADPPH - A_{\text{Extr}})/ADPPH) * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde ADPPH é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução (Roesler et. al, 2007).

4.3.2 Atividade Antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de fotolorimétrico de redução do ferro (FRAP). A técnica do FRAP consistiu inicialmente no preparo da amostra com uma concentração de 2 mg/mL. Logo após, transferiu-se 90 µL para tubos de ensaio e adicionou-se 270 µL de água destilada. Onde foram adicionados 2,7 mL do reagente FRAP, a reação foi processada em banho-maria à 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz.

Em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 515 nm. Foi construída uma curva padrão com ácido gálico nas concentrações que variaram de 50 a 2000 µM (Equação 4). A capacidade de reduzir o ferro do extrato e frações foi expressa por µM ácido gálico/ mg de extrato. os experimentos foram realizados em triplicata (Castelo-Branco et al, 2011).

$$Y = 0,0003x + 0,0137 \quad R^2 = 0,987 \quad \text{Equação 4}$$

4.4 Flavonoides Totais

No método adaptado de Mabry et al, 1970, foram utilizados 10 mg de cada extrato e completado para 100 mL, Uma alíquota de 15 mL foi colocada em balão volumétrico acrescida de 1 mL de solução de cloreto de alumínio e o volume foi completado para 50 mL.

Após repouso de 30 minutos, foi realizada a leitura a 425 nm em espectrofotômetro UV/visível. A análise foi feita em triplicata. Os dados de absorvância das amostras foram comparados com uma curva padrão construída a partir de soluções de rutina. A solução padrão de rutina foi preparada com MeOH 70% numa concentração de 100 mg/mL. A curva padrão foi construída com pontos de 7,5 mg/ml a 15 mg/ml com intervalos de 0,5 mL (Equação 4). O cálculo da concentração de mg de rutina/ g de extrato foi baseada na curva construída (Mabry et al, 1970).

$$Y = 0,0015x - 0,0097 \quad R^2 = 0,9147 \quad \text{Equação 4}$$

4.5 Análise estatística

O programa estatístico utilizado para os ensaios foi o ASSISTAT® Versão 7.7 beta (2016). Foi realizada ANOVA e o teste estatístico empregado para os dados foi o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.6 Avaliação do perfil químico por CLAE

A quantificação das substâncias fenólicas presentes nos extratos avaliados (1417 V, 1417 M, 1613 M e 1613 V) foi realizada utilizando-se metodologia validada por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) descrita por Mendes (2016) e Assis (2014).

Os extratos foram avaliados por CLAE, com a finalidade de comparação, em dois momentos do ano: em Março de 2016 e Dezembro de 2016. Isso ocorreu devido a resultados diferentes do efeito inibitório do crescimento microbiano, que foi observado entre os meses de março e dezembro de 2016.

Os padrões das substâncias fenólicas e o extratos obtido da amostra foram analisados em Cromatógrafo Líquido marca Shimadzu, modelo LC-20A, bombas LC20AD, sendo os cromatogramas monitorados com variação de 230-400 nm para substâncias fenólicas (detector ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M20A) e volume de injeção de 20 µL. Foi utilizada a coluna de fase inversa RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm).

O método utilizado para a quantificação de substâncias fenólicas encontra-se descrito na Tabela 1. Para o gradiente de eluição trabalhado, foi utilizada fase móvel com água ultrapura (tipo MiliQ) acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) na bomba A e acetonitrila na bomba B, com fluxo de 1 mL/min à 35 °C.

Tabela 1. Gradiente de eluição.

Gradiente 1- Bomba A: água MiliQ acidificada; Bomba B: Acetonitrila	
Tempo (min)	Concentração da bomba 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

As amostras foram preparadas para injeção utilizando-se 8 mg de extrato que foram solubilizados em 1 ml da fase móvel (500 µl água MiliQ acidificada e 500 µl da acetonitrila). Os extratos foram filtrados com o auxílio de microfiltros (Sartórios) e seringas descartáveis (BD Plastipak), depois injetados de acordo com o método.

As substâncias que foram utilizadas como padrão foram: ácido gálico, ácido clorogênico e o flavonóide rutina. Os tempos de retenção estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Tempo de retenção e comprimento de onda dos padrões

Padrão	Tempo de retenção(TR)	λ Max (nm)
Ácido gálico	4,867	231-258
Ácido clorogênico	5,338	230-258
Rutina	7,174	255-354

4.7 Atividade antimicrobiana

4.7.1 Microrganismos

Os microrganismos que foram utilizados nos testes de atividade antimicrobiana são: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* (LSA 88), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Salmonella entérica* (ATCC 13076).

4.7.2 Preparo dos inóculos

As cepas dos micro-organismos foram cultivadas em ágar estoque (BHA-Brain Heart agar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativadas para caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5 McF em fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França com o comprimento de onda 550 nm (Araújo et al, 2004).

4.7.3 Atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada a metodologia da diluição em meio líquido (Lemos et al,2000). Os extratos de pimenta foram solubilizados em DMSO P.A. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida realizando-se testes para verificação da inibição do extrato em relação aos micro-organismos.

Para a realização do teste 10 μ L das amostras foram diluídas e adicionadas a 170 μ L do meio Müller Highton (MH) líquido (Acumedia, Índia) em eppendorfs e 20 μ L de suspensão da bactéria utilizada foi inserido ao meio. O inóculo foi padronizado pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Os eppendorfs foram incubados em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas. Após 6 horas, uma alíquota de 50 μ L do conteúdo de cada amostra e controles o conteúdo foi semeado em placas de Petri contendo o meio ágar Muller Hinton (Acumedia, Índia). Após o período de incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C por 24 horas), houve a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e comparação do aspecto de crescimento em relação ao controle contendo o inóculo sem o tratamento e o inóculo contendo um antibiótico comercial (gentamicina) conforme descrito por Lemos et al (2000).

Os controles foram preparados de maneira semelhante aos extratos de pimenta, sendo que foram adicionados 170 μ L de meio MH líquido e 20 μ L de inóculo, 10 μ L do antibiótico gentamicina na concentração de 200 μ g/mL como controle positivo e 20 μ L de inóculo com 170 μ L de meio MH líquido como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e em 3 dias diferentes, totalizando 9 repetições.

4.7.4 Antibiograma

No teste do antibiograma foi avaliado o sinergismo do extrato (utilizado nos tratamentos) em relação a 10 antibióticos comerciais em formatos de discos: Amoxicilina (AMO), Amoxicilina/ ácido clavulâmico (AMC), Ampicilina (AMP), Clindamicina (CLI), Gentamicina (GEN), Oxacilina (OXA), Penicilina (PEN), Vancomicina (VAM), Cefalexina (CFX) e Tetraciclina (TET).

A primeira parte do teste de antibiograma é semelhante ao teste antimicrobiano (Lemos et al, 2000), no entanto a escala utilizada foi em μL ao contrário da autora que utilizou um volume maior de extratos, em mL. Os antibiogramas foram realizados após exposição ao inóculo que permaneceu por 6 horas em estufa a 37°C .

As colônias puras foram semeadas em placas de Muller Hinton em ágar para ensaios de difusão de discos antimicrobianos padrão, de acordo com as recomendações do Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (2003). As zonas de inibição formadas em torno das colônias foram medidas com paquímetro digital (Mytutoio, Brasil).

O programa estatístico utilizado para os ensaios foi o ASSISTAT® Versão 7.7 beta (2016). Foi realizada ANOVA e o teste estatístico empregado para os dados foi o Teste de Tukey ao nível de ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O aumento de tempo de prateleira dos produtos é muito importante na cadeia produtiva de alimentos. Pois, este evita gastos e desperdícios. Uma vez que é conhecido que reações oxidativas e ação microbiana são uns dos principais elementos que colaboram para a redução do tempo de prateleira (Fu et al, 2016; Forsythe, 2013; Soares, 2002). Desta forma, a investigação de novos produtos que possam atuar na redução da ação de microorganismos e atuarem como antioxidantes naturais.

Dentre as moléculas ativas se destacam as substâncias fenólicas e algumas vitaminas como ácido ascórbico que são amplamente encontradas em espécies vegetais (Harbone, 1989).

5.1.1 Teor de fenóis totais

O resultado para fenóis totais seguindo o método de Folin Cicateault revelou que a amostra 1417 M apresentou o maior teor de fenóis totais seguido da amostra 1613 V , 1613M e 1417 V que não diferiram estatisticamente entre si (tabela 3).

Segundo Conforti et al, 2007, pimentas da espécie *C. annuum* apresentaram um maior teor de fenóis totais por Folin Cicateault, em extratos oriundos de frutos verdes. No entanto, o mesmo autor relata que extratos provenientes de frutos verdes e maduros apresentam resultados estatisticamente

semelhantes e esse resultado se assemelha ao verificado no presente experimento.

Tabela 3 : Fenóis totais pelo método de Folin Cicateault presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	Folin Cicateault (mg AG/100 g extrato)
1417 M	163,27±20,21 ^a
1613 M	25,27±8,30 ^c
1417 V	26,61±6,63 ^c
1613 V	93,20±8,28 ^b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito do extrato de acordo com a metodologia aplicada.

No entanto, outros autores relatam em experimentos que frutos maduros apresentaram maior teor de fenóis totais (Folin Cicateault), assim como uma maior atividade antioxidante (pelo método de DPPH) o que pode variar de acordo com a variedade ou genótipo utilizados (Ghasemnezhad et al, 2011).

Na literatura, a avaliação do teor de fenóis totais por Folin Cicateault do pericarpo dos frutos verdes e maduros de *C. baccatum* revelou que frutos verdes continham maiores teores de fenóis em relação as frutos maduros (Kappel et al, 2008).

Conforme observado neste experimento para determinação de fenóis totais (tabela 3 e tabela 4), os resultados obtidos a partir da metodologia de Fast Blue BB e Folin Cicateault foram maiores para os extratos dos genótipos 1613 V e 1417 M. Os genótipos 1613 M e 1417 V apresentaram resultados estatisticamente semelhantes em ambas metodologias adotadas para avaliação dos fenóis totais.

No entanto, quando é realizada a comparação entre as metodologias, os resultados para Folin Cicateault são mais baixos dos que para Fast Blue BB. Esse fator pode ser explicado devido as análises pelo método de Folin Cicateault se revelarem menos precisas do que a metodologia de Fast Blue BB (Lester et al, 2012; Medina, 2011).

Tabela 4: Fenóis totais pelo método de Fast Blue BB presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	Fast Blue BB(mg AG/100 g de extrato)
1417 M	236,78 ±9,24 ^b
1613 M	29,54±0,98 ^c
1417 V	12,84±3,35 ^c
1613 V	272,18±14,14 ^a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito do extrato de acordo com a metodologia aplicada.

A literatura relata que o método de Folin Ciocateault sofre com algumas substâncias como: açúcares, ácido ascórbico, aminas aromáticas, ácidos orgânicos e ferro, o que causa interferência nos resultados diminuindo o valor de fenóis totais encontrado (Lester et al, 2012), e isso pode está relacionado a sua baixa precisão em relação ao método de Fast Blue BB, o que foi possível ser observado no presente estudo.

Quando é observado o perfil químico por CLAE (figura 18 a figura 25) é possível verificar a presença de ácidos fenólicos, devido ao espectro de absorção do UV com uma banda entre 230 e 260 nm, característica de ácidos fenólicos, o qual foi avaliada através de uma metodologia por CLAE específica para análise de substâncias fenólicas (Mendes, 2016; Assis, 2014). No entanto, para a metodologia espectrométrica de Folin Ciocalteau e Fast Blue BB utilizada neste trabalho para quantificar teor de fenóis, os teores de fenóis para as amostras analisadas, foram subestimados, principalmente, em relação ao extrato 1417 V o qual apresentou o perfil mais concentrado de fenóis avaliado por CLAE (figura 18) contradizendo os resultados das metodologias colorimétricas.

As metodologias espectrométricas podem sofrer grandes interferências devidas à coloração forte do extrato avaliado (Araujo et al, 2007). É relatado também, que os teores de outras substâncias, como os capsaicinoides, podem colaborar interferindo em metodologias espectrométricas como a de Folin Ciocalteau (Salvi, 2015).

Portanto, a coloração pronunciada dos extratos avaliados, pode ser um fator limitante para a utilização de metodologias espectrométricas para a avaliação de fenóis totais nestes extratos 1417 V, 1417 M, 1613 V e 1613 M. A avaliação do perfil químico por CLAE pode sugerir que metodologias cromatográficas são mais indicadas para este tipo de análise. Conforme Araujo et al, 2007, a metodologia para reconhecimento e dosagem de fenóis mais indicada é por cromatografia líquida de alta eficiência ou por cromatografia gasosa, dependendo da característica da amostra avaliada.

5.1.2 Ácido ascórbico

Os resultados para vitamina C presente nos frutos de pimenta revelam que frutos maduros apresentam maiores teores desta substância. Segundo a TACO, 2011 os teores de vitamina C para pimentas do gênero *Capsicum* variam de 201,4 a 158, 2 mg de vitamina C/ 100 g de fruto.

Na tabela 5 pode ser verificado que os frutos de pimenta dos genótipos 1417 M e 1613 M, ou seja maduros, se encontram próximos aos da literatura (TACO, 2011).

Tabela 5: Teores de ácido ascórbico presentes em frutos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	Vitamina C-fruto (mg Vit C/100 g de fruto)
1417 M	149,80 ±8,16 ^b
1613 M	222,21±7,02 ^a
1417 V	10,60±2,15 ^c
1613 V	15,59±0,37 ^c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito de acordo com a metodologia aplicada.

Na literatura, Deepa et al (2007), verificaram que frutos verdes (imaturos) apresentam em geral menores concentrações de vitamina C em relação aos frutos maduros e que frutos maduros apresentaram maiores médias de concentração de vitamina C. Bae et al (2012) também constataram que

cultivares de diferentes espécies de pimenta apresentam maiores concentrações médias de vitamina C em frutos maduros.

Os frutos verdes (imaturos), em geral apresentam menos que 50% da concentração de vitamina C que frutos maduros (Bae et al, 2012 ; Deepa et al, 2007). Os frutos verdes apresentam menores médias de vitamina C, pois os teores de vitamina C aumentam com a maturação dos frutos, decaem com a decomposição dos mesmos, além de serem geralmente baixos quando o fruto está imaturo (Deppa et al, 2007).

No presente trabalho, também foi avaliado o teor de vitamina C presente nos extratos de pimentas. Os resultados revelam que mesmo após ser realizado aquecimento (para a obtenção do extrato) e seu posterior armazenamento, houve a presença de uma baixa concentração de vitamina C, que foi maior para os extratos dos genótipos 1417 M e 1613 M e menores para os demais assim como foi verificado nos frutos deste ensaio (tabela 6).

Tabela 6: Teores de ácido ascórbico presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	Vitamina C extrato (mg Vit C/100 g de extrato)
1417 M	11,85 ±2,15 ^{ab}
1613 M	9,36±3,23 ^{ab}
1417 V	3,10±0,74 ^b
1613 V	5,61±0,03 ^b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito de acordo com a metodologia aplicada.

Na figura 12 é possível verificar a redução do teor de vitamina C presentes nos extratos em relação aos frutos da pimenta.

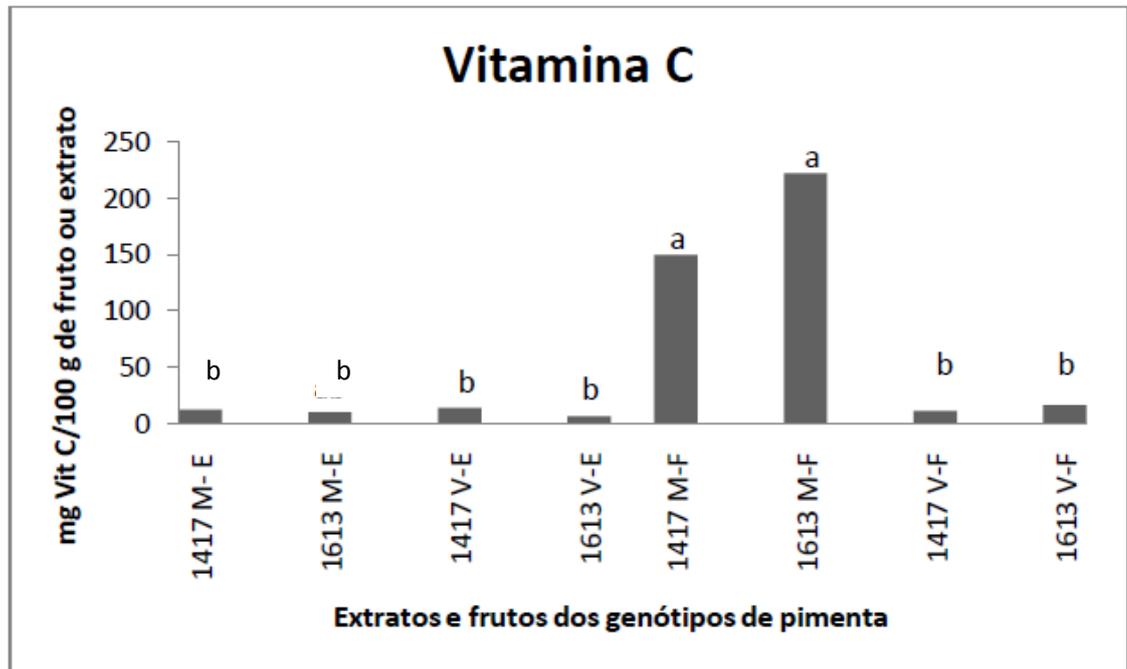


Figura 12: Decaimento do teor de vitamina C em extratos de pimenta *C. baccatum*. A letra E é referente a extrato. A letra F é referente ao fruto.

A redução do teor de vitamina C dos extratos em relação aos frutos frescos se deve ao tipo de processamento, das condições de estocagem, da embalagem e de características inerentes ao suco ou extratos preparados (Zedin et al, 2003). Desta forma, a provável redução do teor de vitamina C avaliado neste ensaio é devida a forma de extração que utiliza aquecimento por meio de Soxhlet à 79°C para o preparo dos extratos.

O estudo dos teores de vitamina C, ácido ascórbico, se faz necessário devido a forte atuação desta substância como antioxidante, inclusive na indústria de alimentos. O ácido ascórbico atua no meio removendo as espécies reativas de oxigênio e as tornando estáveis (Ramalho et al, 2006).

5.1.3 Atividade antioxidante

Para a avaliação antioxidante dos extratos utilizando a metodologia do FRAP (Poder Antioxidante da Redução do Ferro), os valores encontrados neste trabalho variaram com médias de 5,51 a 31,38 μM sulfato ferroso/g de extrato (Tabela 7). Os resultados obtidos revelam que o extrato da amostra 1613 V apresentou maior atividade antioxidante em relação aos outros extratos quando avaliado por FRAP.

Esses valores são semelhantes a testes realizados com o extrato fresco e aquecido de *C. baccatum*, em que os resultados variaram de 15,2 a 9,1 μM sulfato ferroso/g de extrato (Loizzo et al, 2015).

Tabela 7: Atividade antioxidante por FRAP presente em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	FRAP (μM sulfato ferroso/g de extrato)
1417 M	17.84 \pm 2,89 ^b
1613 M	5.51 \pm 0,64 ^c
1417 V	9.56 \pm 1,46 ^c
1613 V	31.38 \pm 4,40 ^a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito do extrato de acordo com a metodologia aplicada.

O teste do FRAP é mais prático em relação a outros métodos para a avaliação da atividade antioxidante de extratos (Deppa et al, 2007). Segundo resultados encontrados na literatura, a atividade antioxidante varia de acordo com a variedade ou genótipo da pimenta e também em relação ao grau de maturação dos frutos. Para Deppa et al, 2007, a maioria dos extratos de pimenta testados apresentaram maior atividade para amostras maduras.

No teste do FRAP é avaliado o poder antioxidante da redução do ferro, em que as substâncias presentes nos extratos produzidos a partir de frutos de pimenta *C. baccatum* possuem capacidade de formar complexos com metais reduzidos e de doar hidrogênio, o que em meio oxidativo pode favorecer a sua ação antioxidante (Rosa et al, 2002).

Em geral, a atividade antioxidante aumenta com o amadurecimento dos frutos de pimenta (Navarro et al, 2006), desta forma então, frutos maduros de pimenta são interessantes para a obtenção de extratos antioxidantes.

Em relação a metodologia de DPPH, os resultados para porcentagem da atividade antioxidante foram semelhantes as concentrações observadas pelo método de FRAP, no entanto, o extrato 1417 M e 1613 V apresentaram atividades estatisticamente semelhantes (tabela 8).

Tabela 8: Atividade antioxidante por DPPH presente em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Extrato	DPPH (%) 1000 µg/mL
1417 M	86,61±3,05 ^a
1613 M	4,39±1,35 ^c
1417 V	33,64±2,92 ^b
1613 V	83,64±2,89 ^a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito do extrato de acordo com a metodologia aplicada.

Em ensaios realizados com extratos de pimenta de diversas variedades comerciais, foi verificado que a porcentagem de atividade antioxidante apresentou faixas de 95,1 a 18,5 % e isso variou devido à variedade e tipo de extração utilizada nos experimentos (Bae et al, 2012).

Na literatura foi possível verificar, que no caso da avaliação da atividade antioxidante por DPPH, segundo o estágio de maturação dos frutos, o extrato do fruto verde (imaturo) apresentou maior atividade em relação ao extrato do fruto maduro (Conforti et al, 2007).

O maior teor de fenóis está relacionado à maior atividade antioxidante (Conforti et al, 2007). Desta maneira, pode ser verificado que no presente ensaio os resultados de fenóis totais e atividade antioxidante foram compatíveis aos relatados na literatura.

O período de colheita dos frutos, estágio de maturação, local de cultivo e condições de armazenamento dos frutos alteram a composição de substâncias fenólicas (Soares et al, 2008).

Segundo Costa et al, 2010, o extrato etanólico bruto de *C. baccatum* apresentou um baixo teor de fenóis (Folin Cicateault) comparados a extração com acetato de etila e clorofórmio.

No entanto, no presente trabalho, para a mais alta concentração avaliada no método antioxidante por DPPH, este extrato apresentou valores de atividade antioxidante semelhantes ao extrato extraído com clorofórmio em trabalhos verificados por Costa e colaboradores em 2010. Ou seja, o tipo de

extração altera composição e concentração das substâncias fenólicas e isso pode influenciar na sua atividade antioxidante.

Neste estudo foram construídos gráficos mostrando a relação entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante. É possível observar a relação direta entre a alta concentração de fenóis e a atividade antioxidante para as metodologias espectrométricas adotadas (figuras 13,14,15,16).

A correlação positiva entre atividade antioxidante e teores de fenóis totais em extratos vegetais. Ou seja, o aumento dos teores de fenóis totais favorece a ação antioxidante (Carvalho et al, 2014; Dastmalchi et al, 2011).

A relação positiva entre atividade antioxidante e teor de fenóis totais indicam que devido ao aumento da concentração de fenóis há o aumento da atividade antioxidante. A relação neste experimento é verificada, pois, com o aumento do teor de fenóis há o aumento da atividade antioxidante (figura 13, figura 14, figura 15, figura 16).

Na figura 13 é possível verificar que entre as amostras avaliadas a maior concentração de fenóis (metodologia de Folin Ciocalteu) foi para a amostra 1417 M e 1613 V respectivamente e a atividade antioxidante por metodologia de FRAP foi superior para 1613 V e 1417 M, o que indica que o aumento dos teores de fenóis é relacionado ao aumento da atividade antioxidante.

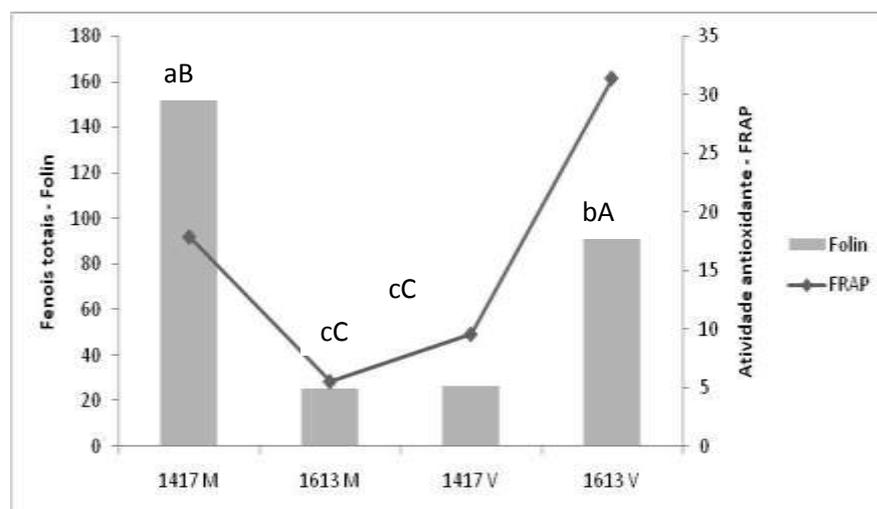


Figura 13: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante. A letra minúscula indica Folin Ciocalteu e a letra maiúscula indica o FRAP. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da figura 14, indicaram que os maiores teores de fenóis totais seguindo a metodologia de Folin Cicateault foram para os extratos 1417 M e 1613 V respectivamente. Em relação à atividade antioxidante os maiores resultados foram para 1417 M e 1613 V . Desta forma, houve uma relação entre o aumento do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. O que sugere que o aumento de fenóis favorece a ação antioxidante dos extratos, conforme foi observado da mesma forma por Dastmalchi et al, 2011.

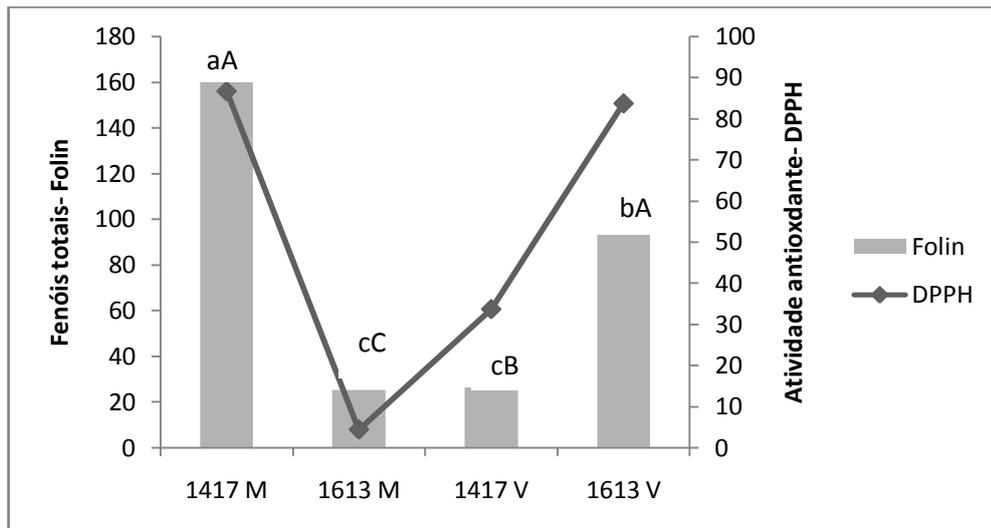


Figura 14: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante. A letra minúscula indica o Folin Ciocalteau e a letra maiúscula indica o DPPH. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A sensibilidade do método de DPPH em relação aos extratos avaliados foi alta. O método de DPPH em geral é um método menos seletivo quanto à análise das substâncias, pois, pode interagir com alguns radicais alquil e assim oferecer uma curva de resposta maior (Roginsky e Lissi, 2005). Para fins de análises mais completas é indicado que o método de DPPH seja aplicado junto à outra metodologia, como o método antioxidante por FRAP, por exemplo, que confere maior rigor a avaliação (Ciesla et al, 2012).

A metodologia antioxidante por FRAP se apresenta mais rigorosa em relação ao método de DPPH, para essas amostras. A metodologia por FRAP é menos rigorosa e funciona reduzindo substâncias fenólicas (Rosa et al, 2002). Portanto, ela possui característica mais seletiva quanto à avaliação da ação antioxidante quando comparada a metodologia de DPPH.

Os resultados apresentados na figura 15 relatam, que os maiores teores de fenóis totais segundo a metodologia de Fast Blue BB foram para os extratos 1613 V e 1417 M, respectivamente.

Desta forma, a relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante foi favorável. Pois, com o aumento dos fenóis houve um aumento na ação antioxidante. Para os resultados apresentados na figura 16, é possível verificar que os melhores teores de fenóis totais são correspondentes aos extratos 1613 V e 1417 M, respectivamente. Os extratos responsáveis pela maior ação antioxidante foram os 1613 V e 1417 M.

Desta maneira, é possível observar a existência de uma correlação entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante, quando as metodologias de Fast Blue BB e FRAP são empregadas para a realização das análises.

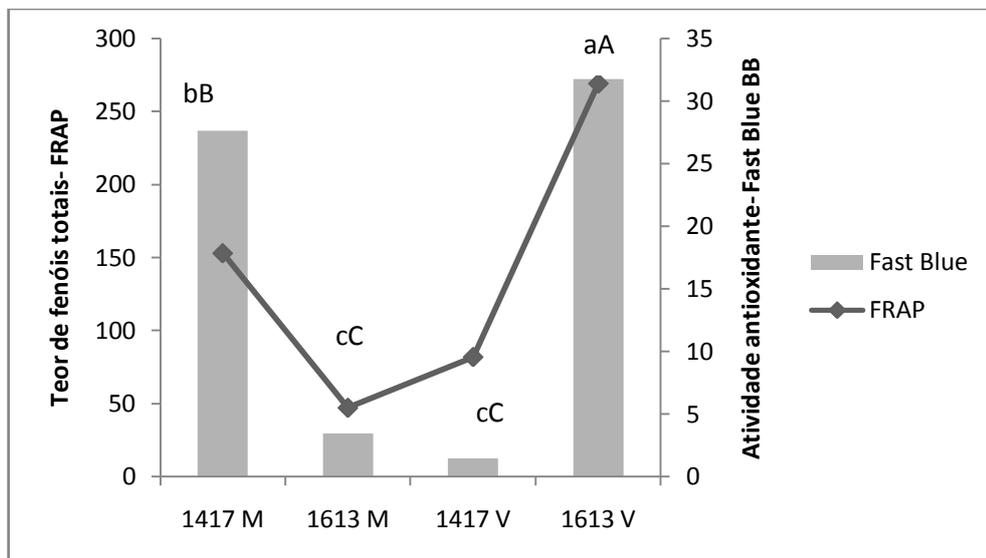


Figura 15: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante. A letra minúscula indica o Fast Blue e a letra maiúscula indica o FRAP. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

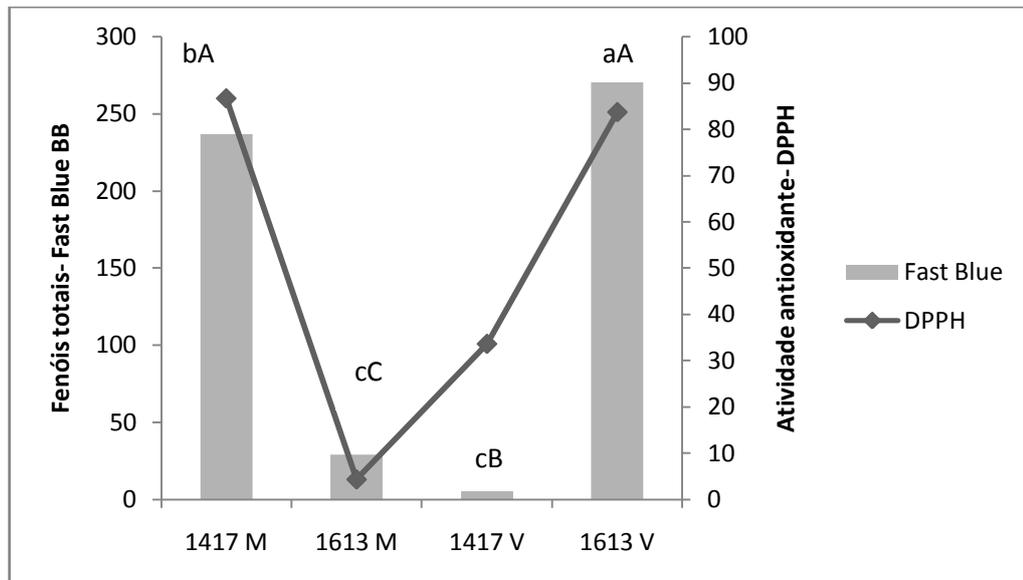


Figura 16: Relação entre teor de fenóis totais e atividade antioxidante. A letra minúscula indica o Fast Blue e a letra maiúscula indica o DPPH. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Conforme mencionado anteriormente, o método de atividade antioxidante por FRAP é mais rigoroso que a metodologia de DPPH (Rosa et al, 2002). A partir dos resultados é possível verificar através dos resultados, que o método de sequestro do radical livre DPPH apresentou maior efeito antioxidante quando comparado a metodologia de FRAP.

Quando são comparadas as metodologias de fenóis totais, os resultados mostram que as concentrações são menores quando avaliados por Folin Cicalteault e maiores por Fast Blue BB. Ocorre, que o método de Fast Blue BB se mostrar menos interferente que a metodologia de Folin Cicateault (Lester et al, 2012).

No entanto, ambos os métodos se apresentaram menos precisos em relação à metodologia cromatográfica utilizada no presente experimento. Conforme recomendado na literatura, a melhor metodologia para fenóis totais é a avaliação por métodos cromatográficos (Araujo et al, 2007). A relação entre o aumento do teor de fenóis e o aumento da atividade antioxidante, depende do tipo de metodologia aplicada para a avaliação (Roesler et al, 2007).

No presente trabalho, houve relação positiva entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante em todas as metodologias avaliadas e nos extratos avaliados (figura 13, figura 14, figura 15, figura 16). Os resultados corroboram com Kappel et al, 2008, que avaliou a correlação entre atividade antioxidante e teor de fenóis totais para extratos de *C. baccatum*.

Segundo a literatura, a relação positiva entre o teor de fenóis e atividade antioxidante pode sugerir que uma das substâncias responsáveis por essa ação pertence, a classe das substâncias fenólicas, muitas das vezes presentes em frutos, sementes, raízes e folhas de espécies vegetais (Carvalho et al, 2014). Em extratos de pimenta é possível encontrar uma correlação positiva entre a ação antioxidante e o teor de fenóis totais (Menichini et al, 2009).

5.1.4 Teor de flavonoides totais

O extrato produzido a partir do fruto do genótipo 1417 M apresentou o maior teor de flavonóides em relação aos outros extratos avaliados que não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 9).

Tabela 9: Teor de flavonoides totais presentes em extratos dos acessos UENF 1417 e UENF 1613 em dois estádios de maturação.

Flavonoides Totais (mg de rutina/g de extrato)	
1417 M	10.44 ± 2,3 ^a
1613 M	2.99 ± 2,56 ^b
1417 V	4.49 ± 1,35 ^b
1613 V	3.54 ± 0,78 ^b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas na mesma coluna revelam o efeito do extrato.

Os teores de flavonóides totais estão dentro dos valores encontrados na literatura (Sricharoen et al, 2016, Bae et al, 2012), no entanto, são comparáveis aos valores mais baixos encontrados entre os acessos investigados.

A baixa concentração de flavonóide, neste presente trabalho, pode ser sugerida a partir do perfil químico por CLAE que priorizou a investigação de compostos fenólicos. Segundo a metodologia adotada (Assis, 2014) os perfis químicos por CLAE apresentam ácidos fenólicos e não foi possível identificar picos compatíveis ao perfil químico de flavonóides (figura 17,20,22,24).

Segundo experimentos realizados por Bae et al (2012), frutos maduros de pimenta da variedade “Paprica” apresentaram um teor de flavonóide total igual a

PA137 (86.6 µg/g ou 0,0076 mg/g) e o fruto imaturo Mesilla (48,8 µg/g ou 0,0866 mg/g). Em sementes de *C. frutescens* de frutos maduros o teor de flavonóide variou segundo o tipo de extração que foi utilizada (hexânica ou cloroformica), sendo, os maiores teores encontrados para o extrato produzido utilizando hexano o qual obteve resultado de 12,84 mg de rutina/ g de extrato. Variedades de pimentas maduras apresentaram variação de 6,54 a 23,11 mg de flavonóide/ g de extrato (Sricharoen et al, 2016).

Em geral extratos de frutos maduros apresentam maiores teores de flavonóides totais em relação aos extratos de frutos maduros. Isso pode está relacionado ao fato da classe dos flavonóides aumentar a concentração de acordo com o acréscimo da maturação dos frutos. O inverso pode ser observado em taninos (Bae et al, 2012).

5.1.5 Perfil químico por CLAE

Os padrões ácido gálico e ácido clorogênico foram eleitos para o ensaio, pois são ácidos fenólicos amplamente encontrados em espécies de pimentas do gênero *Capsicum* (Assis, 2014; Kappel et al, 2008).

A análise do perfil químico dos extratos por CLAE de padrões comerciais revelaram que os ácidos fenólicos em geral apresentam pico com tempo de retenção entre 4,8 e 5,3 min e o seu espectro entre 230 e 254 nm (tabela 10) para a metodologia analítica adotada (Assis, 2014). Ao se realizar uma comparação entre os cromatogramas das amostras em relação ao padrão foi verificada a presença de ácidos fenólicos nas amostras de extrato de pimenta de todos os genótipos avaliados, que foi verificado devido ao espectro de absorção de UV.

Tabela 10: Tempo de retenção e comprimento de onda dos padrões

Padrão (Sigma®)	Tempo de retenção(TR)	λ Max (nm)
Ácido gálico	4,867	231-258
Ácido clorogênico	5,338	230-258
Rutina	7,174	255-354

Na literatura, é descrito que a maioria dos ácidos fenólicos possui tempo de retenção em torno dos primeiros minutos de corrida cromatográfica (3 a 14 min) e espectro de absorção entre 250 a 350 nm apresentando apenas uma banda (Harborne, 1989). O ácido gálico é descrito como uma substância que possui tempo de retenção entre 3 mim ou 13 mim e espectro de absorbância entre 200 a 350 nm compreendendo uma banda de absorção (Mira et al, 2008; Chung et al, 2007;Harborne, 1989).

Os espectros de UV característicos para as substâncias fenólicas possuem comprimento de onda entre 230 e 340 nm ou 200 a 350 nm e podem sofrer ionização devido a ação de compostos básicos, ocasionando um desvio batocrômico de 15 a 50 nm, assim ocasionando aumento de absorbância (Harbone, 1989). Substâncias como os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (figura 17) ou do ácido benzóico são caracterizadas estruturalmente pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e radicais hidroxila ou metil presentes na estrutura (Soares, 2002).

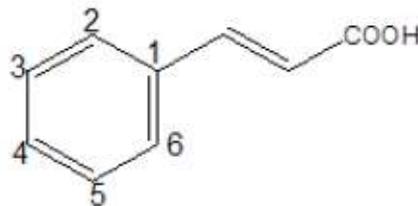


Figura 17: Estrutura do ácido cinâmico

Os ácidos fenólicos podem apresentar estruturas simples, como as do ácido gálico, ou ainda realizarem ligações entre si ou com outros compostos, como ocorre com o ácido clorogênico. Podem ainda, formar estruturas complexas denominadas taninos (Soares, 2002).

O perfil químico avaliado por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) revelou que na amostra 1417 V avaliada em março de 2016 (figura 18) existe a presença de um pico marjoritário em torno dos 13 minutos, e de acordo com o espectro de absorção (UV) e banda de absorção entre 240 nm a 260 nm característica de ácidos fenólicos (figura 18).

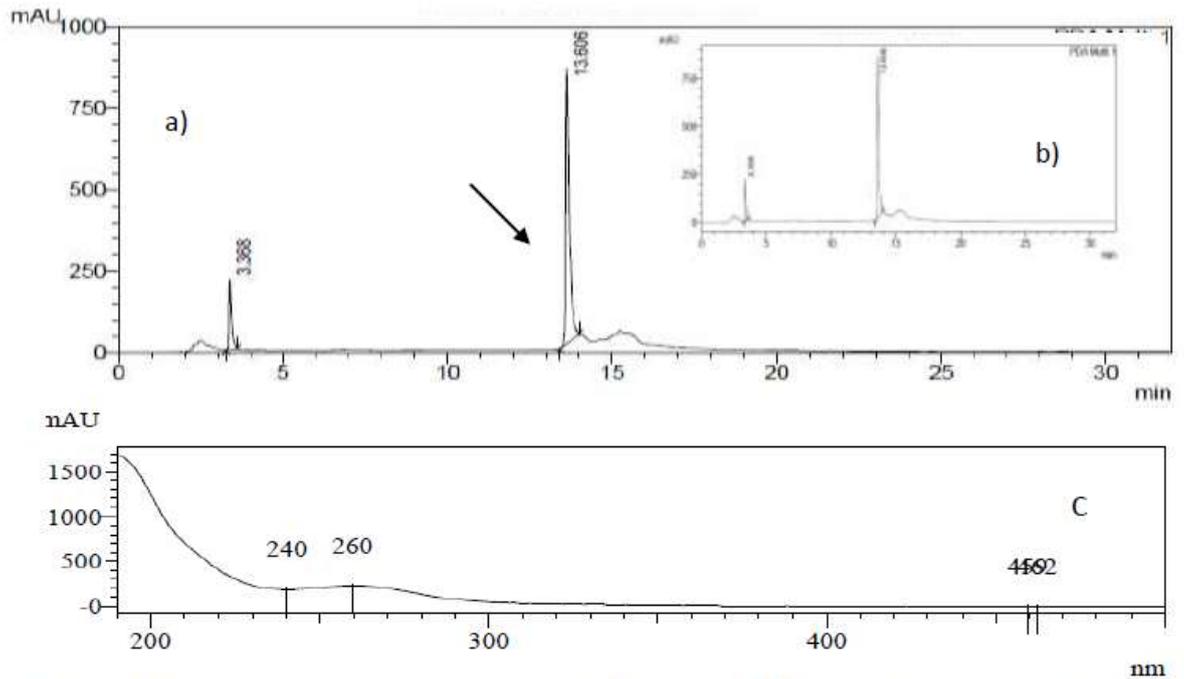


Figura 18: Perfil químico por CLAE com escala a 1000 mAU (a), perfil químico por CLAE a 750 mAU (b) e espectro de UV (c) da amostra 1417 V avaliado em março de 2016

Este mesmo extrato (1417 V) avaliado em dezembro de 2016 (figura 19 a) apresenta um perfil químico por CLAE, um pouco mais complexo entre 3 e 5 min e um pico em torno dos 12 min, semelhante aquele observado na análise em março de 2016 (figura 18) o espectro de absorção (UV) com uma banda entre 245 nm a 265 nm é possível observar que há diferença entre a concentração das substâncias que estão presentes na amostra 1417 V avaliada em março, e em dezembro de 2016 (figuras 18, 19).

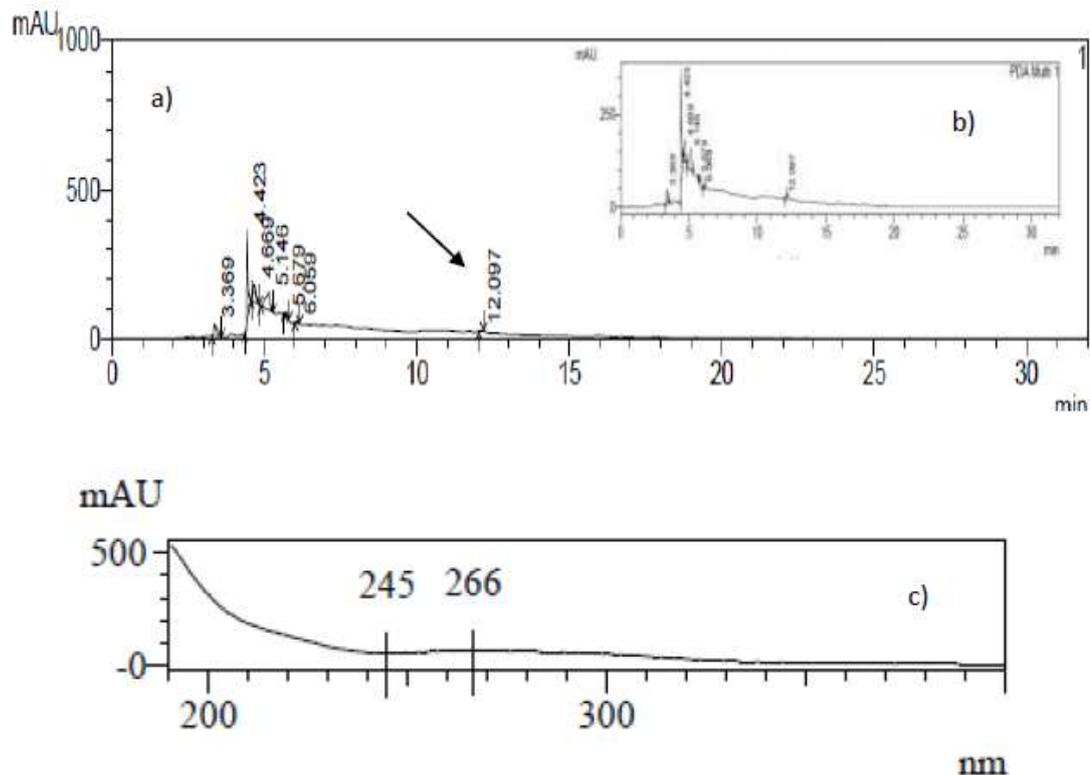


Figura 19: Perfil químico por CLAE com escala a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE a 250 mAU (b) e espectro de UV (c) da amostra 1417 V avaliada em dezembro de 2016

Para a amostra 1417 V foram verificadas alterações no perfil químico por CLAE entre as avaliações realizadas em maio e dezembro (figura 18) em relação às outras amostras avaliadas no presente trabalho. O pico predominante, em torno de 12 a 13 min apresentou decréscimo de sua concentração quando foi novamente avaliado por CLAE cerca de 9 meses após a primeira análise.

Alguns extratos sofrem com o processo de alteração de suas substâncias bioativas, o que pode explicar o ocorrido com o extrato 1417 V (figura 18 e 19). A diferença nos perfis químicos do extrato pode ser total ou simplesmente ocorrer uma queda da concentração (Carvalho et al, 2010). Um fator importante que ocasiona a modificação do perfil químico de um extrato bruto é a presença de inúmeras substâncias que podem interagir num meio reacional e formar novos produtos (Maciel et al, 2006; Ministério da Saúde, 2004).

De acordo com o perfil químico por CLAE da amostra 1417 V (figura 18, 19) há presença de substâncias como ácidos fenólicos neste extrato. O fato foi comprovado quando foi realizada a comparação entre o espectro de absorção (UV) que foram semelhantes aos de ácidos fenólicos utilizados (Tabela 10).

A extração com o uso de etanol é capaz de priorizar alguns compostos fenólicos, dentre estes se encontram os ácidos fenólicos (Varea et al, 2001). Desta forma, é possível dizer que a utilização do solvente etanol nos extratos de certa maneira foi capaz de extrair ácidos fenólicos dos frutos utilizados para as amostras, o que pode explicar a presença de ácidos fenólicos no perfil químico das amostras por CLAE.

A amostra 1417 M avaliada em março de 2016 apresentou em seu perfil químico por CLAE um pico em torno de 12 min e seu espectro de absorção apresentou uma banda de absorção com comprimentos de onda entre 237 nm e 256 nm, indicando ser de característica de substâncias do perfil dos ácidos fenólicos (figura 20).

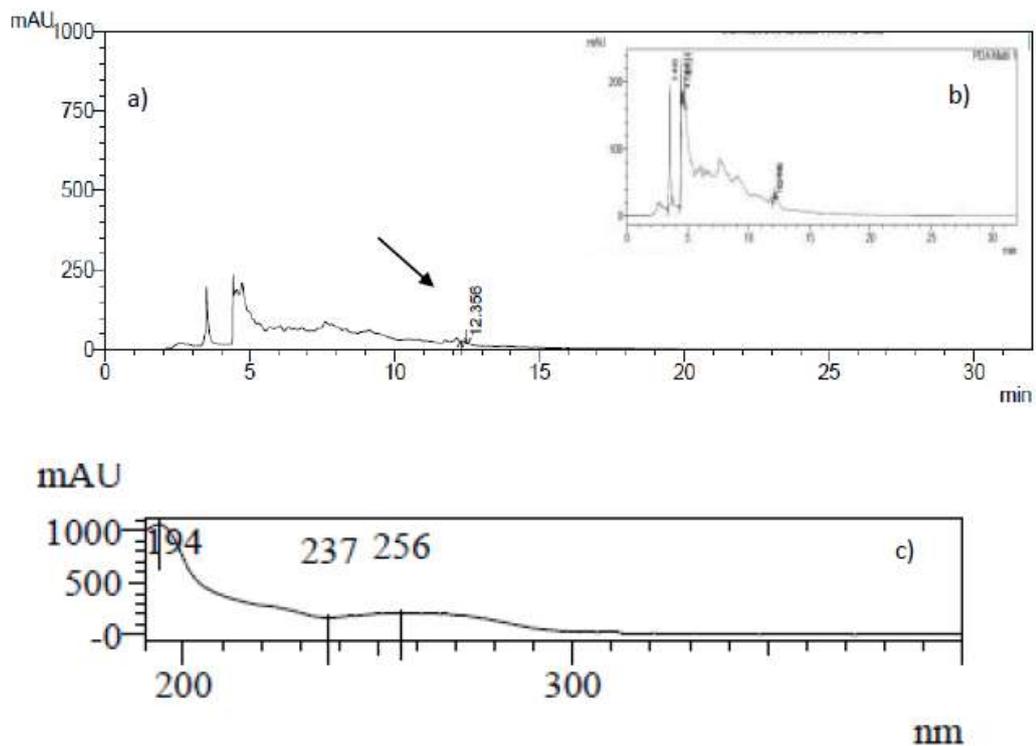


Figura 20: Perfil químico por CLAE com escala a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE com escala a 200 mAU (b) e espectro de UV (c) da amostra 1417 M avaliado em março de 2016.

O perfil químico da amostra 1417 M avaliado em dezembro de 2016 (figura 21) revelou a existência de um pico em torno dos 12 min que apresentou uma banda no espectro de absorção (UV) em torno dos 241 nm a 255 nm, o que indica se tratar de substâncias do perfil dos ácidos fenólicos.

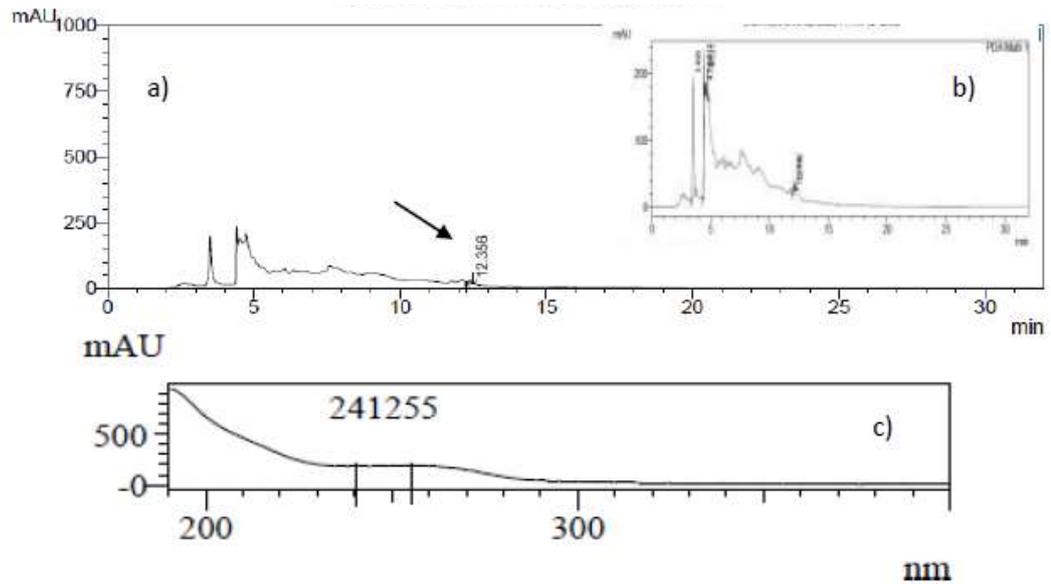


Figura 21: Perfil químico por CLAE com escala a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE com escala a 200 mAU e espectro de UV (c) e da amostra 1417M avaliado em dezembro de 2016

O perfil químico avaliado por CLAE da amostra 1613 V avaliada em março de 2016 (figura 22) mostra a presença de um pico em 12 min que possui uma banda com espectro de absorção em UV em torno de 240 nm a 258 nm.

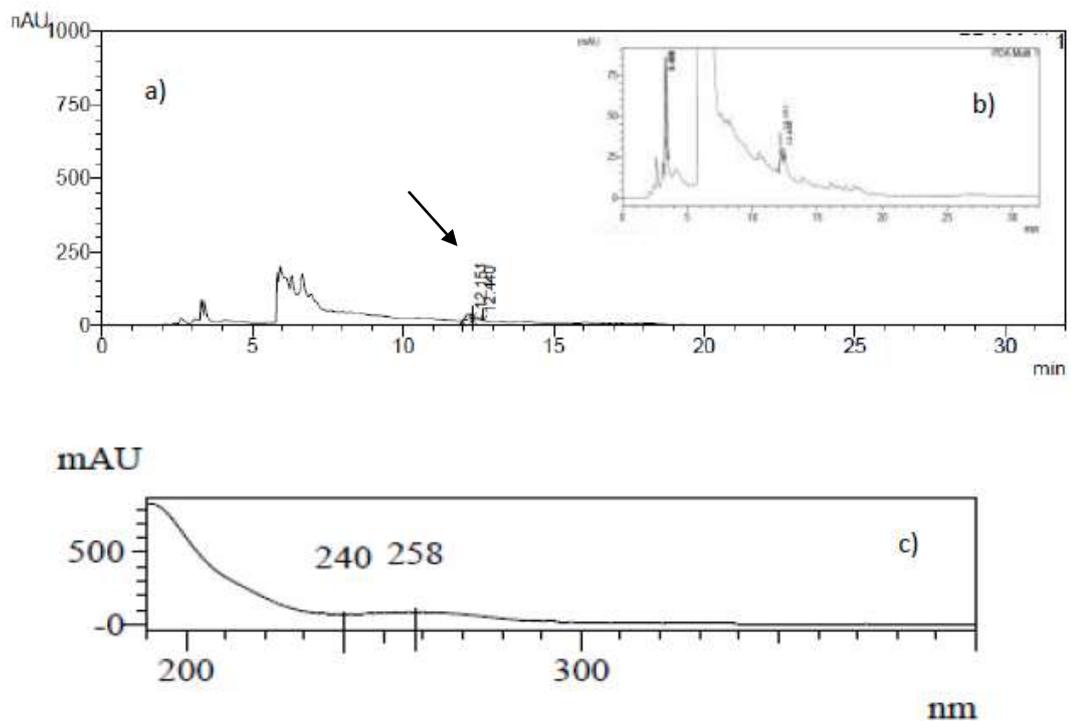


Figura 22: Perfil químico por CLAE a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE a 75 mAU (b) e espectro (c) da amostra 1613 V avaliado em março de 2016.

O perfil químico da amostra 1613 V avaliada em dezembro de 2016 (figura 23) apresenta o mesmo perfil observado anteriormente (figura 22). A presença de um pico em torno dos 12 min que possui uma banda com espectro de absorção (UV) entre 240 nm a 258 nm que pode indicar a presença de ácido fenólico na amostra. A avaliação deste pico indica que se trata de um ácido fenólico.

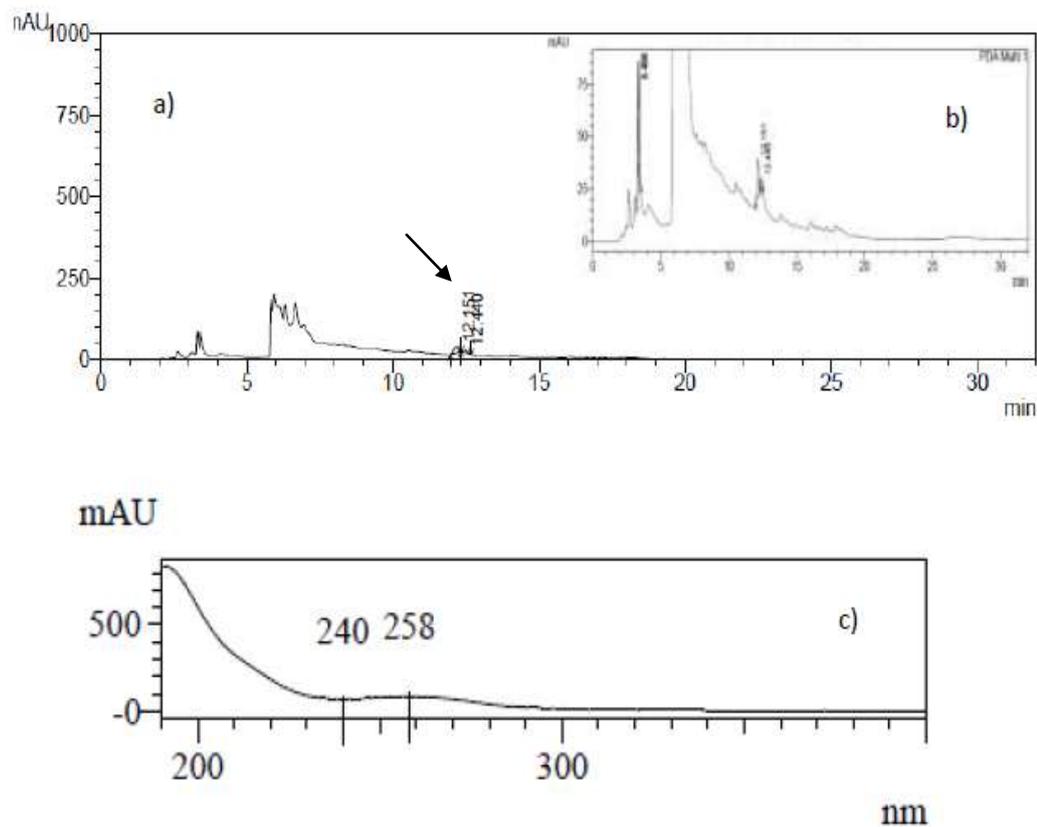


Figura 23: Perfil químico por CLAE a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE a 75 mAU (b) e espectro (c) da amostra 1613 V avaliada em dezembro de 2016.

O perfil químico por CLAE da amostra 1613 M (figura 24) avaliada em março de 2016 apresentou um pico em torno de 12 min, possui uma banda com espectro de absorção (UV) em torno de 243 nm a 355 nm, o que indica se tratar de substâncias com perfil de ácidos fenólicos.

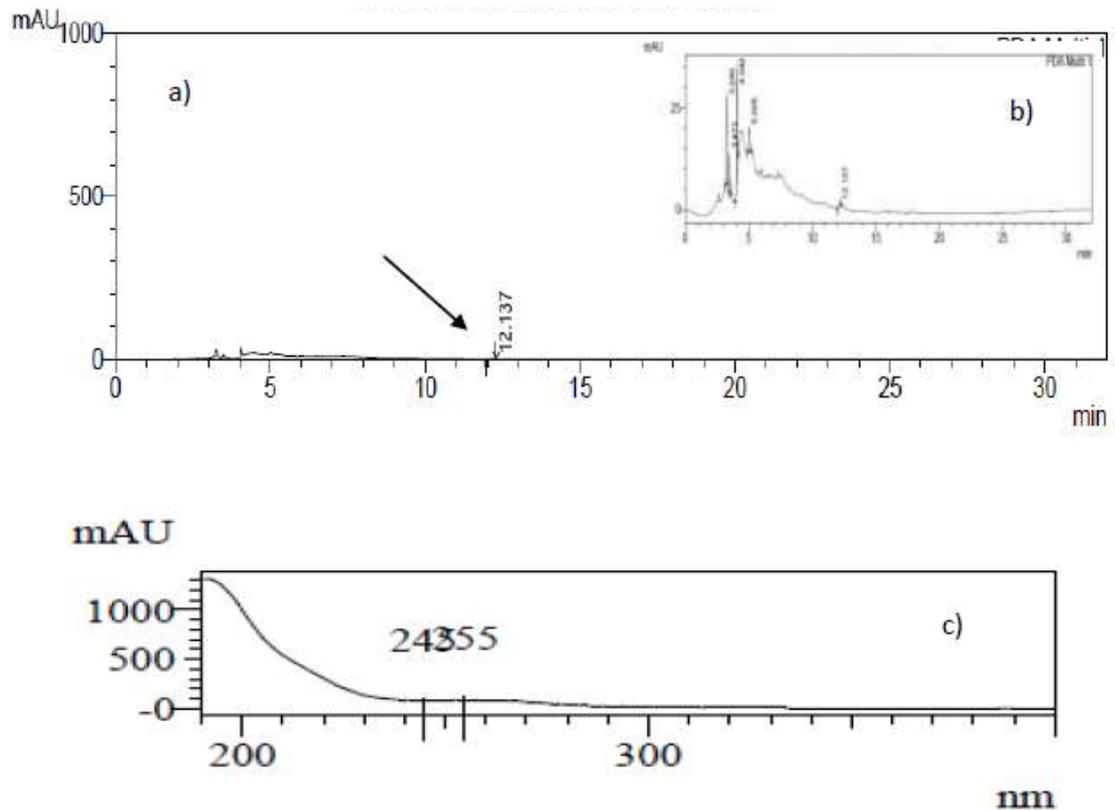


Figura 24: Perfil químico por CLAE a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE a 25 mAU (b) e espectro (c) da amostra 1613M avaliado em março de 2016.

O perfil químico por CLAE da amostra 1613 M (figura 25) avaliada em dezembro de 2016 apresentou um pico em torno de 12 min com que possui uma banda com espectro de absorção (UV) em torno de 272 nm a 313 nm, o que indica se tratar de substâncias com perfil de ácidos fenólicos. O perfil químico da amostra 1613 M avaliado em março e dezembro de 2016 não diferiu (figura 24, 25).

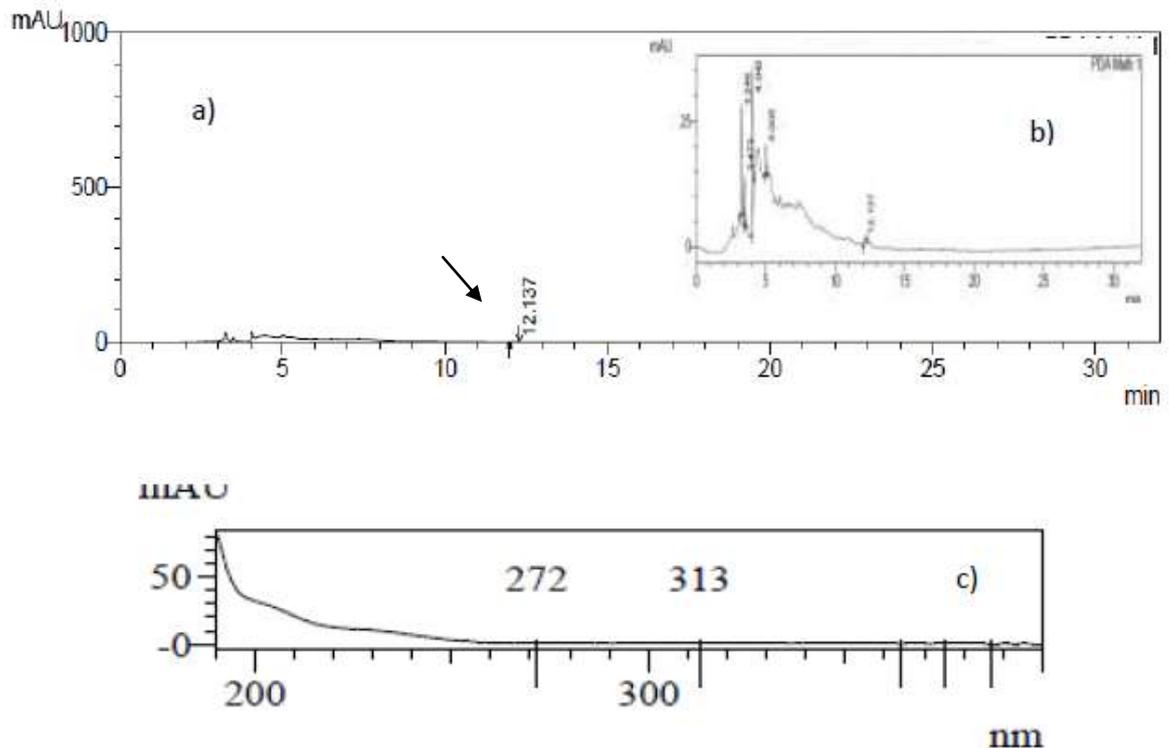


Figura 25: Perfil químico por CLAE a 1000 mAU (a) , perfil químico por CLAE a 25 mAU (b) e espectro (c) da amostra 1613M avaliado em dezembro de 2016.

Em geral, todos os extratos apresentaram perfil de ácido fenólico, ou seja, com tempo de retenção nos primeiros 15 min, pico representativo de ácido fenólico em cerca de 12 a 13 min e espectro de absorção entre 200 e 300 nm conforme os cromatogramas mostraram (figura 18, figura 19, figura 20, figura 21, figura 22, figura 23, figura 24 e figura 25). Este pico em torno dos 12 min é comum a todos os extratos nas duas épocas em que foram avaliados por CLAE. As amostras 1417 V, 1417 M, 1613 V e 1613 M apresentam perfil químico muito semelhantes entre si, diferindo apenas nas concentrações dos picos detectados por CLAE.

A mudança no tempo de retenção e no comprimento de onda de absorção no espectro de UV foi verificada em todos os perfis químicos por CLAE, pode ser devida a ação do efeito de desvio batocrômico (Harbone, 1989), pela alteração da fase móvel conforme foi verificado na mesma pimenta em ano diferente (Mendes, 2016) ou ainda devido a própria natureza do extrato que pode ter sofrido ações que resultem em sua alteração química (Maciel et al, 2006), resultando em pequenas diferenças em seu perfil químico.

Na literatura é relada a presença de ácidos fenólicos em pimentas do gênero *Capsicum*. Essas substâncias são relacionadas a diversas atividades

biológicas, tais como, atividade antioxidante e antimicrobiana (Bae et al, 2012; Kappel et al, 2007; Soares, 2002).

5.2 Atividade antimicrobiana

5.2.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Os resultados para o teste antimicrobiano revelaram que o extrato 1417 V apresentou inibição total do crescimento microbiano de *S. aureus* quando foi utilizada uma concentração de 250 ppm. Desta forma, foi necessário encontrar uma concentração de mínima inibitória (MIC) que foi verificada no extrato de concentração 200 ppm. Este extrato apresentou inibição (entre $30 < \text{UFC} < 300$) frente ao crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 25923 (tabela 11).

Os demais extratos não apresentaram atividade frente ao tratamento com os extratos: 1417 M, 1613 M e 1613 V, pois foi observado um crescimento de colônias semelhante ao controle sem a gentamicina.

Segundo a literatura, extratos de pimenta apresentaram atividade frente a bactérias do gênero *Staphylococcus* (Carvalho et al, 2010; Cruz et al, 2003).

No entanto, segundo Kappel et al, 2008, não houve inibição do crescimento de *S. aureus* por parte do extrato produzido por sementes dos frutos de *Capsicum*, o que evidencia que diferentes partes do vegetal e fases de maturação podem apresentar diferentes resultados nos testes antimicrobianos.

Tabela 11: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) no teste antimicrobiano.

	<i>S aureus</i> ATCC 25923	<i>S aureus</i> ATCC 33591	<i>S epidermidis</i> ATCC 12228	LSA 88	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> ATCC 13076	<i>E coli</i> ATCC 22922
1417 M	NI	NI	126,00 ± 4,00	NI	NI	NI
1613 V	NI	NI	150,33 ± 14,57	NI	239,33 ± 36,25	NI
1613 M	NI	NI	144,33 ± 1,53	NI	NI	NI
1417 V	79,00 ± 6,56	186, 33 ± 17,95	30,33 ± 1,53	116,67 ± 14,57	NI	NI

*NI indica que não houve inibição

* Concentração mínima inibitória > 30 e < 300 UFC

*para a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 a MIC foi 200 ppm.

*para as demais bactérias a MIC foi de 250 ppm

A literatura relata que a presença de substâncias fenólicas em extratos vegetais pode conferir ação antimicrobiana frente a cepas do gênero *Staphylococcus* (Kappel et al, 2008; Elzaawely et al, 2005; Pinto et al, 2001).

A presença de ácidos fenólicos pode ser constatada através de perfil químico avaliado por CLAE (figura 17) que confirmou a presença dessa classe de substâncias, que são as prováveis responsáveis pela atividade antimicrobiana observada nos experimentos. Os ácidos fenólicos atuam nas membranas microbianas ou no mecanismo enzimático, o que pode impedir o crescimento microbiano (Ravishankar et al, 2012).

5.2.2 *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591)

A bactéria *Staphylococcus aureus* de ATCC 33591 é conhecida por ser resistente ao antibiótico metilina e é chamada de MRSA (Mark et al, 2002). Os resultados indicam que houve inibição microbiana com o uso do tratamento contendo o extrato 1417 V que revelou um crescimento de colônias entre $30 < UFC < 300$ (tabela 11).

Os demais extratos avaliados não apresentaram atividade antimicrobiana frente ao crescimento de *S. aureus* de ATCC 33591 (tabela 11). Quando comparado com o crescimento de *S. aureus* de ATCC 25923, o crescimento de colônias foi maior para esta cepa ATCC 33591 que poderia ser devido a sua alta resistência bacteriana (Rich et al, 2005).

A literatura relata a atividade antibacteriana de extratos de pimenta frente ao crescimento de diferentes cepas da espécie *S. aureus* (Carvalho et al, 2010; Kappel et al, 2008).

A atividade antimicrobiana está diretamente relacionada a presença de substâncias fenólicas (Kappel et al, 2008). Conforme foi verificado por meio de CLAE, o extrato 1417 V possui um perfil cromatográfico que indica a presença de ácidos fenólicos (figura 18) e também revelaram uma concentração superior as outras amostras avaliadas (figura 20, 22 e 24).

Os ácidos fenólicos detectados em pimentas do gênero *Capsicum* possuem atividade antimicrobiana já descrita na literatura (Bae et al, 2012; Kappel et al, 2008). Os teores de substâncias fenólicas, confirmados neste trabalho também confirmam que a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato está

ligada a seu perfil químico (figura 18). Na literatura, é possível verificar que a presença de substâncias fenólicas além de favorecerem a ação antioxidante, também agem como antimicrobianos (Elzaawely et al., 2005).

5.2.3 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Os resultados para *Staphylococcus epidermidis* indicam que todos os extratos apresentaram capacidade antimicrobiana (tabela 11). É possível verificar a partir dos resultados que o extrato 1417 V apresentou a maior inibitória sobre o crescimento de *S. epidermidis* (tabela 11). Também é possível verificar que isso pode ser devido a maior concentração de substâncias fenólicas presentes em seu perfil químico (figura 18), quando este é comparado aos outros extratos (figuras, 20, 22, 24).

S. epidermidis é uma bactéria conhecida por ser multiresistente e formadora de biofilme (Cegelski et al, 2008). Na literatura é relatada a dificuldade que a indústria de alimentos encontra para eliminar a formação de biofilmes. Atualmente é conhecido, que o tratamento prévio com extratos de plantas que possuem atividade antibiofilme, podem reduzir a adesão das bactérias as superfícies (Sandasi et al, 2010).

A espécie *S. epidermidis* possui seu crescimento inibido quando utilizado extrato bruto de *Salvia* (Schito et al, 2011). No presente estudo, foi verificada a atividade antimicrobiana dos 4 extratos avaliados (tabela 11). Esses resultados podem sugerir uma correlação em relação ao seu perfil químico por CLAE, que apresentou a presença de ácidos fenólicos (figura 17, 19, 21,23). Os ácidos fenólicos, monômeros de taninos, são descritos como substâncias que possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme (Wittschier et al, 2007).

A presença de ácidos fenólicos no perfil químico dos extratos (figura 17, 20,22,24) podem ser associadas a ação antimicrobiana que os extratos apresentaram. Na literatura, são descritas que substâncias fenólicas possuem ação antimicrobiana frente a bactérias da cepa *Staphylococcus* (Li et al, 2012).

5.2.4 LSA 88

A bactéria LSA 88 (cepa secretora de enterotoxinas) é da espécie *Staphylococcus aureus* e foi isolada do leite de mastístico bovino (Vieira- Motta et al, 2001; Vieira-Motta, 1997).

Os resultados do teste antimicrobiano para a cepa LSA 88 revelaram que apenas o extrato 1417 V foi capaz de inibir o crescimento microbiano (tabela 11). É possível relacionar esse fato ao seu perfil químico por CLAE que indicou uma alta concentração de ácidos fenólicos (figura 18).

Segundo o trabalho de Dutra et al, 2016, em que foram avaliados extratos bruto de *Punica granatum* L. (romã) , *Anacardium occidentale* L. (cajueiro) e *Psidium guajava* L. (goiabeira), foi possível verificar a atividade antimicrobiana frente ao crescimento da cepa clínica LSA 88 e os resultados foram semelhantes à Carlos et al, 2010.

Na literatura até o presente momento não foi descrita a atividade antimicrobiana para os extratos de *C. baccatum* sob a cepa clínica de LSA 88. Sendo portanto este trabalho, o pioneiro a relatar a atividade antimicrobiana dos extratos de frutos verdes e maduros de *C. baccatum* sob a cepa de LSA 88.

5.2.5 *Escherichia coli* ATCC (22922)

A cepa *E. coli* ATCC 22922, não apresentou inibição frente ao crescimento microbiano por parte de todos os extratos avaliados (tabela 11). O que corrobora com os resultados encontrados na literatura, quando extratos de pimenta das espécies *C. annuum* e *C. frutescens* foram avaliadas em relação ao crescimento da *E. coli* ATCC 22922 e não apresentaram inibição do crescimento (Koffi-Nevry et al, 2012). O efeito contrário foi observado com o uso de extrato etanólico de pimentão verde (*Capsicum chinense*), em que se observou a inibição do crescimento de *E. coli* (Colivet et al, 2012).

Desta forma, é possível inferir que a presença de ácidos fenólicos nos extratos de *C. baccatum* não foi capaz de inibir o crescimento microbiano de *E. coli*. Embora o perfil químico por CLAE (figura 17,19,21,23) apresentem substâncias com potencial antimicrobiano e a relação entre atividade antioxidante e teor de fenóis seja positiva, o resultado revelou a ausência de atividade antimicrobiana. No entanto, isso corrobora com o descrito na literatura para o

gênero *Escherichia* spp quando foram utilizados extratos de *C. baccatum* (Carvalho et al, 2005).

5.2.6 *Salmonella enterica* (ATCC 13076)

Os resultados para *Salmonella enterica* indicam que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre o crescimento desta bactéria. Porém, apenas o 1613 V apresentou inibição bacteriana, apresentando crescimento abaixo de 300 colônias (tabela 11).

Alguns autores verificaram a inibição do crescimento de colônias de espécies de *Salmonella* por parte da utilização de extratos de pimentas do gênero *Capsicum* (Koffi-Nevry et al, 2012; Careaga et al, 2002).

Careaga et al, 2003, verificou que ao tratar carne bovina triturada e adicionada com extratos de pimenta do gênero *Capsicum* houve inibição do crescimento de *Salmonella*.

Os resultados indicam que a atividade antimicrobiana do extrato 1613 V avaliados pode ser relacionada a presença de ácidos fenólicos (figura 17, 19,21,23). Visto que, segundo a literatura os ácidos fenólicos possuem tal atividade relatada (Soares, 2002).

No caso verificado no extrato 1613 V, a atividade antioxidante também foi observada (tabelas 7, 8), o que faz deste extrato o melhor dentre os avaliados, pois combina ação antimicrobiana e antioxidante que são requeridas para um bom conservante natural (Brasil, 2007).

5.3 Avaliação do antibiograma

A avaliação do antibiograma é realizada com a finalidade de revelar o sinergismo entre antibióticos comerciais e extratos vegetais contra o crescimento microbiano de cepas oriundas de colônias puras.

5.3.1 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Os resultados para o teste antimicrobiano com a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 revelam, que o uso dos discos de antibiótico no tratamento

controle com o extrato 1417 V não diferiu estatisticamente, conforme observado na linha da tabela 12.

Tabela 12: Antibiograma da cepa *S aureus* (25923) tratadas com extrato 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em Agar

	1417 V	Controle
AMO	31,06 Aabc	32,18 Aab
AMC	30,74 Aabc	32,83 Aa
AMP	39,82 Aa	32,79 Aa
CLI	33,36 Aab	27,70 Aab
GEN	26,33 Abc	24,31 Aab
OXA	24,39 Abc	23,09 Aab
PEN	32,43 Aab	32,08 Aab
VAM	20,80 Ac	19,94 Ab
CEX	33,33 Aab	31,04 Aab
TET	31,66 Aab	29,52 Aab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (extrato) e letras maiúscula na linha (antibiótico) diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. A unidade está em milímetros (mm).

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxicilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

A literatura relata, que o sinergismo entre extrato de *Capsicum baccatum* para inibir cepas de *S aureus* isoladas de pacientes, não há verificação de halo de inibição com o uso de cloranfenicol, ceftazidima, fluconazol. No entanto há presença de um halo de inibição de 28 mm com o uso de ampicilina (Kappel et al, 2008). No presente trabalho, todos os antibióticos utilizados tiveram como efeito um halo de inibição e estatisticamente não houve diferença significativa entre o controle e extratos (tabela 12).

No entanto, segundo os resultados, houve diferença em relação ao efeito do extrato com o uso dos discos de antibiótico e sem o uso dos discos de antibióticos, que está apresentado na coluna da tabela 10 e o melhor antibiótico foi a ampicilina, tanto para o extrato (1417 V que o perfil fora avaliado em dezembro de 2016) quanto para o controle (tabela 12).

Em outros estudos, foram verificados halos de inibição em testes de sinergismo entre extratos de pimentas maduras do gênero *Capsicum* e discos de antibióticos comerciais, em que houve halo ao serem utilizadas penicilina, tetraciclina e ampicilina (Arora et al, 2008).

Os resultados sugerem que a atividade antimicrobiana encontrada no presente estudo, está relacionada ao fato do perfil químico por CLAE apresentar a

presença de ácidos fenólicos, que possuem atividade biológica ativa para a inibição de microorganismos (Kappel et al, 2007; Deepa et al, 2005), conforme foi verificado através da utilização de metodologia cromatográfica apropriada para a investigação de substâncias fenólicas.

Esses resultados podem ser explicados com base no perfil químico verificado no extrato. No começo do presente estudo (março de 2016), o perfil químico do extrato 1417 V apresentava a presença de um pico dominante de ácido fenólico em torno dos 13 minutos (figura 26). No entanto, ao decorrer do tempo, quando o extrato 1417 V foi avaliado novamente em dezembro de 2016, foi observado que o pico dominante diminuiu sua concentração em relação à primeira vez que foi avaliada (figura 26).

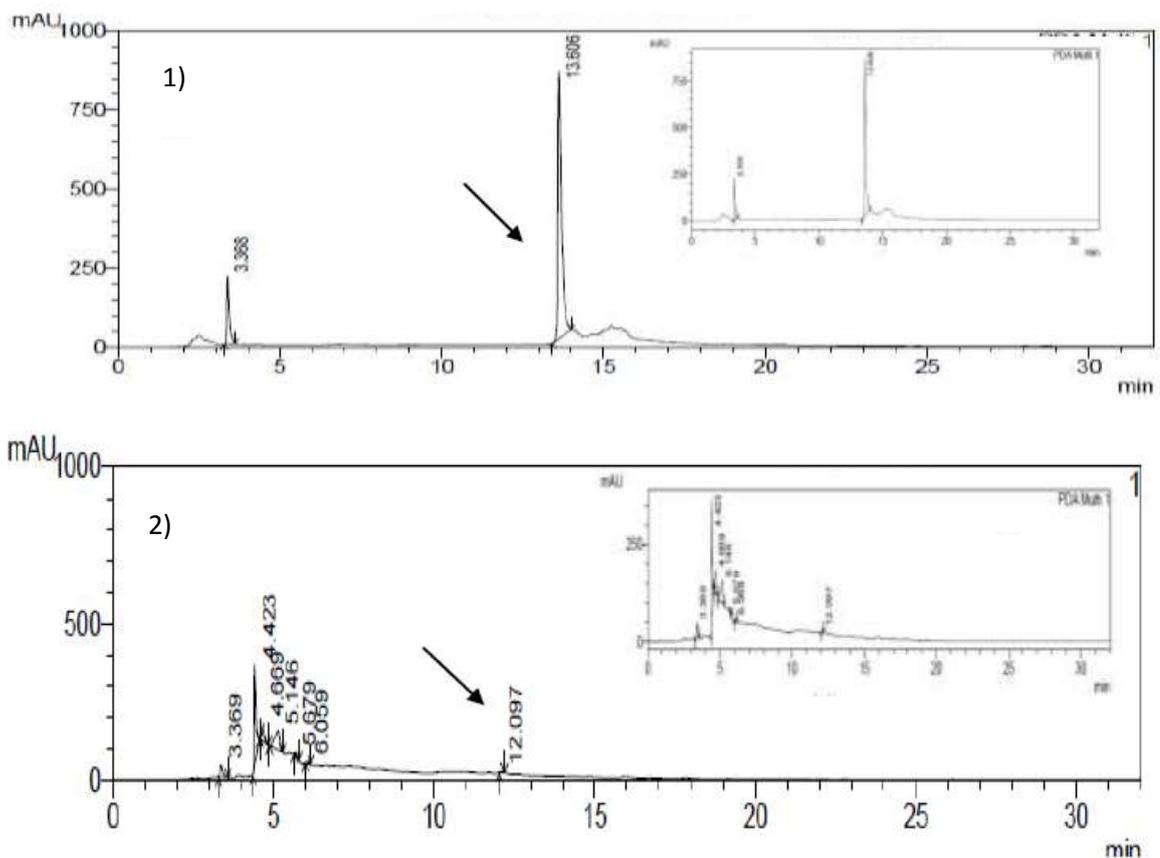


Figura 26: Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliada em março de 2016 (1). Perfil químico por CLAE da amostra 1417 V avaliada em dezembro de 2016 (2).

Desta forma, é sugerir que a redução da concentração desta substância não favoreceu a atividade antimicrobiana dos extratos avaliados. O que denotou na queda de sua atividade que pode ser relacionada à diminuição da concentração desta substância neste extrato de pimenta.

Na literatura, há relatos de que substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos, por exemplo, possuem potencial antimicrobiano. Pois, são capazes de complexar algumas proteínas extracelulares e a parede bacteriana (Falcão et al, 2002). Segundo a tabela 13, a cepa avaliada se mostrou sensível aos tratamentos propostos, os halos de inibição foram maiores do que 14 mm.

Tabela 13: Resistência e sensibilidade de *S aureus* (25923) em relação aos tratamentos com extrato 1417 V de *Capsicum baccatum* e controle.

	1417 V	Controle
AMO	S	S
AMC	S	S
AMP	S	S
CLI	S	S
GEN	S	S
OXA	S	S
PEN	S	S
VAM	S	S
CEX	S	S
TET	S	S

*R-resistente **S- sensível

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

* A sensibilidade foi verificada de acordo com a tabela do Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobiology (CLSI).

5.3.2 *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591)

Em relação ao teste de antibiograma, não foi possível verificar halos de inibição com o uso do extrato de pimenta. O resultado, em princípio não foi o esperado, visto que, em relação aos 4 extratos utilizados, o extrato 4 (1417 V) apresentou atividade antimicrobiana (tabela 12).

No entanto, observando o perfil químico por CLAE deste extrato, é possível notar que o mesmo contém um pico majoritário (figura 33), esse foi o extrato avaliado na época dos testes antimicrobianos (tabela 11). Todavia quando foi realizada a avaliação do teste de antibiograma, o pico majoritário verificado

anteriormente reduziu sua concentração (figura 26), o que implicou na ausência da atividade relatada anteriormente.

Desta maneira, segundo o perfil químico do extrato 1417 V avaliado por CLAE, em duas épocas diferentes (março 2016 e dezembro de 2016), foi possível verificar que a redução da concentração da substância majoritária (figura 26) fez com que houvesse perda da atividade antimicrobiana.

5.3.3 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Os resultados para o ensaio realizado com *S epidermidis* indicam que houve diferença significativa entre a utilização dos extratos com discos de antibióticos e apenas com o uso dos discos para os seguintes antibióticos: gentamicina, oxacilina e tetraciclina que apresentaram halos de inibição superiores ao controle, o que está indicado na linha da tabela (tabela 14).

Em relação ao efeito dos extratos com os discos de antibióticos, verificados na coluna, o melhor efeito foi para ampicilina, clindamicina, gentamicina e cefalexina em conjunto com o extrato 1417 M, ampicilina, clindamicina, gentamicina e cefalexina em conjunto com o extrato 1613 V, cefalexina em conjunto com o extrato 1613 M e gentamicina em conjunto com o extrato 1417 V e para o controle o melhor efeito foi para cefalexina (tabela 14).

Tabela 14: Antibiograma da cepa *S epidermidis* (12228) tratadas com extrato 1417 M, 1613 V, 1613 M, 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.

	1417 M	1613 V	1613 M	1417 V	Controle
AMO	16,91 Abcd	9,96 Abcd	16,94 Abcd	10,28 Ab	15,17 Abc
AMC	24,22 Aab	19,98 Aab	21,32 Abc	16,25 Aab	17,54 Aab
AMP	22,17 Aa	34,47 Aa	33,54 Aabc	25,04 Aab	21,66 Aab
CLI	32,88 Aa	37,82 Aa	33,51 Aab	21,82 Aab	21,72 Aab
GEN	29,56 Aa	33,74 Aa	33,58 Aabc	42,00 Aa	26,63 Bab
OXA	33,37 Acd	11,45 Bcd	24,26 Aabc	28,44 Aab	21,52 Babc
PEN	22,39 Abc	21,06 Abc	21,22 Acd	20,22 Ab	13,14 Abc
VAM	27,40 Aab	27,12 Aab	22,94 Aabc	23,00 Aab	20,9 Aabc
CEX	34,20 Aa	33,8 Aa	38,32 Aa	11,2 Bab	30,67 Aa
TET	7,02 Bd	18,14 Ad	11,38 Ad	14,46 Ab	4,86 Bc

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (extrato) e letras maiúsculas na linha (antibiótico) diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. A unidade está em milímetros (mm).

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxicilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

Na literatura há relatos de halos de inibição formados com a utilização de extratos de especiarias, como alho, e discos deste antibiótico (Arora et al, 1999). No entanto, Cichewicz et al, 1996, observou que extratos de pimenta do gênero *Capsicum* não apresentaram inibição frente ao crescimento de *S epidermidis*, fato contrário ao obtido no presente estudo.

Em estudos com extrato bruto de *Rauvolfia grandiflora* foi possível verificar que o tratamento com este extrato, comparado ao controle, proporcionou a presença de halos de inibição maiores que o controle em todos os antibióticos avaliados para esta cepa, o que mostra a sensibilidade de *S epidermidis* ao tratamento com os extratos vegetais (Carlos et al, 2010).

A atividade antimicrobiana relatada e o sinergismo positivo entre extratos de *C. baccatum*, verificadas neste trabalho, estão diretamente relacionadas ao perfil químico dos extratos, que conforme já mencionado, possuem presença de ácidos fenólicos. Desta forma, todos os extratos preparados a partir de *C baccatum* apresentaram atividade antimicrobiana para *S epidermidis*.

Na tabela 15, é possível verificar o comportamento de sensibilidade e resistência de *S epidermidis* quando submetido ao tratamento dos discos com e sem os extratos avaliados. No caso do antibiótico ampicilina, o controle apresentou um comportamento resistente e quando houve tratamento com os extratos 1613 V, 1613 M e 1417 V houve sensibilidade. Para tetraciclina, a utilização dos extratos 1613 V e 1417 V promoveram a sensibilidade microbiana.

Tabela 15: Resistência e sensibilidade de *S. epidermidis* (12228) em relação aos tratamentos com extratos de *Caspicum baccatum* e controle.

	1417 M	1613 V	1613 M	1417 V	Controle
AMO	R	R	R	R	R
AMC	S	S	S	S	S
AMP	R	S	S	S	R
CLI	S	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S	S
OXA	S	R	S	S	S
PEN	R	R	R	R	R
VAM	S	S	S	S	S
CEX	S	S	S	R	S
TET	R	S	R	S	R

*R- resistência ** S- sensível

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxicilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

* A sensibilidade foi verificada de acordo com a tabela do Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobiology (CLSI).

Segundo Medeiros et al, 2009, ao verificar resistência de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica, foi possível observar que o antibiótico que possuía o efeito mais resistente era a ampicilina.

No presente estudo, a ampicilina apresentou controle resistente. No entanto, o tratamento com os extratos 1613 V, 1613 M e 1417 V em conjunto a este antibiótico favoreceu sua sensibilidade, o que sugere que os extratos citados são promissores agentes antimicrobianos.

5.3.4 LSA 88

Os resultados para a cepa LSA 88 revelaram que o extrato 1417 V, em que o perfil químico foi avaliado em dezembro de 2016, apresentou maiores halos de inibição para os antibióticos amoxicilina/ácido clavulâmico, ampicilina e tetraciclina quando comparados ao controle sem o tratamento com o extrato (tabela 16).

Quando comparado o efeito do extrato 1417 V em conjunto com os discos de antibióticos, o antibiótico amoxicilina/ácido clavulâmico apresentou melhor efeito (tabela 16).

Tabela 16: Antibiograma da cepa LSA 88 tratadas com extrato 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.

	1417 V	Controle
AMO	37,32 Aab	29,53 Aa
AMC	41,92 Aa	31,42 Ba
AMP	36,87 Aabc	29,35 Bab
CLI	33,63 Abc	28,14 Acd
GEN	21,50 Acde	19,72 Abc
OXA	28,77 Acde	21,48 Abc
PEN	28,77 Abcd	21,48 Aabc
VAM	27,55 Abcd	24,38 Ad
CEX	13,09 Ae	12,91 Ae
TET	9,58 Ae	2,00 Bab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (extrato) e letras maiúscula na linha (antibiótico) diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. A unidade está em milímetros (mm).

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxicilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

Segundo a literatura, quando utilizado extrato bruto de *Rauvolfia grandiflora*, foi possível observar que o sinergismo dos discos de antibiótico com o extrato avaliado favoreceu o aumento do halo de inibição para todos os antibióticos avaliados (Carlos et al, 2010).

Este fato não foi verificado no presente estudo, pois, apenas os antibióticos amoxilina, amoxilina/ácido clavulâmico, ampicilina e tetraciclina apresentaram halo de inibição superior ao controle (tabela 16).

No entanto, isto pode ser explicado devido à natureza do extrato utilizado na época das avaliações de antibiograma. O extrato sofreu uma redução de concentração da substância majoritária, como pode ser observado no perfil químico avaliado por CLAE (figura 33), este fato pode ter contribuído para a não diferença estatística verificada na maioria dos antibióticos (tabela 16).

5.3.5 *Salmonella enterica* (ATCC 13076)

Para a cepa *Salmonella enterica* o extrato 1613 V apresentou resultados significativos para ampicilina, cefalexina e tetraciclina quando comparados com o controle dentro da linha da tabela (tabela 17).

Quando comparados, os valores dentro das colunas da tabela 18 é possível observar que o tratamento com clindamicina, cefalexina e tetraciclina em conjunto com o extrato 1613 V apresentaram melhores efeitos (tabela 17).

Tabela 17: Antibiograma da cepa *Salmonella enterica* (ATCC 13076) tratadas com extrato 1417 M, 1613 V, 1613 M, 1417 V e submetidas a 10 antibióticos. Avaliadas pelo método da difusão em ágar.

	1613 V	Controle
AMO	28,32 Aa	24,84 Ab
AMC	33,23 Aa	27,98 Aab
AMP	32,32 Aa	25,83 Bb
CLI	6,30 Abc	5,37 Ac
GEN	30,67 Aa	30,13 Aa
OXA	5,60 Abc	4,53 Acd
PEN	9,31 Ab	6,77 Ac
VAM	1,66 Ac	1,33 Ad
CEX	30,66 Aa	24,28 Bb
TET	31,78 Aa	26,31 Bb

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (extrato) e letras maiúsculas na linha (antibiótico) diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. A unidade está em milímetros (mm).

*** AMO-amoxicilina, AMC-amoxicilina/ácido clavulâmico,AMP-ampicilina, CLI-clindamicina.GEN-gentamicina, OXA-oxacilina,PEN-penicilina, VAM-vancomicina,CEX-cefalexina, e TET-tetraciclina.

Segundo a literatura, extratos bruto de *C. annum* promoveram a inibição de *Salmonella*, que foi apresentado no halo de inibição formado (Dorantes et al, 2000). Para extratos de *C. frutescens* foi verificado que houve halos de inibição semelhantes entre extrato hexânico e extrato clorofórmico de *C. frutescens* (Gurnani et al, 2016). Quanto aos extratos de *C. baccatum*, há relatos de inibição de crescimento em cepas de *S. enterica* (Carvalho et al, 2005).

Por fim, a literatura descreve que substâncias fenólicas, tais como os ácidos fenólicos podem apresentar ação frente ao crescimento microbiano. (Ahn et al, 2007). Desta forma, a utilização de extratos vegetais em substituição aos conservantes utilizados atualmente pela indústria de alimentos é desejável devido à ação antimicrobiana e antioxidante amplamente relatada (Cruz-Galvez et al, 2013; Ahn et al, 2007).

6 RESUMO E CONCLUSÕES

A proposta da dissertação foi avaliar substâncias antioxidantes presentes nos extratos dos acessos de pimenta UENF 1417 e UENF 1613 e a atividade antimicrobiana, para assim recomendá-los como possíveis substituintes de conservantes sintéticos utilizados em alimentos. Pois, conservantes sintéticos podem ser associados a efeitos deletérios ao organismo humano, além de toxidez já relatada por outros autores (Broinizi et al, 2008; Degáspari, 2005).

O presente trabalho foi realizado no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro na época de fevereiro de 2015 a janeiro de 2017. Os frutos de pimenta, oriundas do banco de germoplasma da UENF, *Capsicum baccatum* foram obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação (UAP-UENF) e colhidos 100 dias após a semeadura (fruto verde) e 160 dias após a semeadura (fruto maduro). A extração foi realizada por Soxhlet com utilização do solvente a 70 %. Foram avaliados teores de fenóis totais, Teor de vitamina C, atividade antioxidante, perfil cromatográfico por CLAE, atividade antimicrobiana e teste do antibiograma.

O extrato 1417 M e 1617 V apresentaram maiores teores de fenóis segundo os métodos colorimétricos, no entanto não foi a melhor metodologia para os extratos avaliados.

O maior teor de flavonóides totais avaliado foi para o extrato 1417 M. O fruto e extratos do acesso 1417 M e 1613 M apresentaram maiores teores de vitamina C.

O perfil químico avaliado por CLAE sugere a presença de ácidos fenólicos em todos os extratos. O que pode explicar a atividade antimicrobiana.

O extrato 1417 V apresentou atividade antimicrobiana para todas as bactérias do gênero *Staphylococcus* avaliadas. Todos os extratos inibiram o crescimento de *S epidermidis* (ATCC 12228).

O extrato 1613 V teve efeito contra *Salmonella enterica* (ATCC 13096). Nenhum extrato apresentou efeito sob a *E coli* (ATCC 25922).

Os resultados para a ação antimicrobiana dos extratos sob as cepas avaliadas sugerem que ácidos fenólicos podem estar envolvidos na inibição do crescimento bacteriano.

Para a avaliação antimicrobiana e teste do antibiograma, os extratos preparados com frutos verdes apresentaram melhores resultados.

Desta forma, é possível sugerir que os extratos de pimenta (principalmente os de estágio de maturação verde) dos acessos avaliados possuem promissora ação conservante, pois, possuem atividade antioxidante e antimicrobiana e podem atuar como conservantes naturais em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA (2007), Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes", que consta como Anexo da presente Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 de janeiro de 2007.
- Ahn, J.; Grün; I. U.; Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, London, 24 (1): 7-14.
- Amié, D.; Davidovié-amié, D; Beslo, D.; Trinajstić, N. (2003) Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids..*Chemica Acta*, Croatica 76 (1): 55 – 61.
- Angelo, P M, Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66 (1): 1-9.
- Araújo, J M A. (2008) Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 596p.
- Araújo, R; Rodrigues, A G; Pina-vaz, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 53:783-786.
- Assis, M L V (2014). Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var.

- pendulum. Dissertação (Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 117 p.
- Arora , D S; Kaur, J (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12: 257–262
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC (1997) Official methods of analysis. Arlington: Patrícia Cuniff (Ed.), p.37-10, 42-2, 44-3, 45- 16.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995) Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists. Arlington. 957 p.
- Baldwin, A E; Mahenthiralingam, P; Drevinek, P; Vandamme, J. R; Govan, D. J; Waive, J. J.; Lipuma, L.; Chiarini, C.; Dalmastrri, D.; Henry, D. P.; SPEERT, D.; Honeybourne, M. C.; Maiden, C. G; Dowson. (2007). Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 458-461.
- Barbosa, F.H. F Bambirra , F. H. S. ; Barbosa, L. P. J. L.; Faustino, S. M. M. ; Nicoli, J. R. (2012). Propriedade antimicrobiana de extrato de pimenta (*Capsicum frutescens* L.) contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. *Revista de biologia e ciências da terra.* 12(2).
- Bae, G.K.; Jayaprakasha, J J; Bhimanagouda, S. P.(2012). Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 134: 1912–1918.
- Bergamaschi, C. C. (2006). Efeito do diclofenaco sódico sobre a biodisponibilidade da amoxicilina em humanos. Dissertação Faculdade de Odontologia, UNICAMP.
- Berg, J. M. T. E; Lubert, J. (2008). Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p.
- Berg, M. E (1993). Plantas medicinais na Amazônia – Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém, Museu paraense Emílio Goeldi, 207p.
- Bernardes, N. R. (2010). Estudo da Composição Química e dos Efeitos Imunofarmacológicos do Extrato dos Frutos da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Dissertação (Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 99 Páginas.

- Bernardes, N. R; Araújo, M. H; Borges, I. F. J. C; Almeida, F. M.; Amaral, E P; Lasunskaiab, E. B; Muzitano, M. F; Oliveira, D. B. (2014). Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 644-650
- Broinizi, P R; Wartha, RSA; Silva, A; Torres, RP; Azeredo, H M C A; Alves, RE; Mancini-filho, J (2008). Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44 (4): 774-780.
- 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.).. *Food Science and Technology*, 44 (2): 363–369.
- 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, 24 (1) : 173-187.
- Careaga, M; Fernandez, E; Dorantes, L; Mota, L; Jaramillo, M E; Hernandez-sanchez, H (2003).Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 331– 335.
- Carlos, L.A.; Amaral, K.A.S.; Vieira, I.J.C; Mathias, L; Braz-filho, R; Samarão, S.S; Vieira-da-motta, O (2010). *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with staphylococcal density, enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 612-620.
- Carvalho, A. V; Mattietto, R. A; Rios, A. O; Moresco, K. S. (2014). Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. *Pesquisa. Agropecuária Tropical*, Goiânia, 44 (4) : 399-408.
- Carvalho, H H; Wiest, J.M.; Cruz, F.T. (2010) Atividade antibacteriana in vitro de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s., Botucatu, 12(1) : 8-12.

- Carvalho, H.H.C;Cruz, FT; Wiest, J.M (2005). Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 7(3): 25-32.
- Carvalho, H.H.C; Wiest, J.M.; Greco, D.P. (2006). Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracuncululus* Linn. (Asteraceae), variedade inodora - estragão - frente a *Salmonella* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (1) : 75-9.
- Carvalho, L.M.; Casali, V.W.D (1999). Plantas medicinais e aromáticas: relação com luz estresse e insetos. Viçosa, UFV,148p.
- Carrizo, G. S; Sterpetti, M; Volpi, P; Ummarino, M; Saccardo, F. (2013). Wild *Capsicum*: Identification and in situ analysis of Brazilian species. XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and Eggplant. Torino, Italy. 205-213p.
- Cegelski, L; Marshal, G R; Eldridge, G R; Hultgren, SJ (2009). I The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 17-27.
- Champe, P C; Harvey, R. A; Ferrier, D. R. (2009). Bioquímica ilustrada. 4 ed. Porto Alegre: Artmed., 533 p.
- Chung, H. S; Shin, J. C.(2007). Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo). *Food Chemistry*, 104 (4) :1670-1677.
- Cichewicz, R H; Thorpe, P A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine.*Journal of Ethnopharmacology* 52: 61-70
- Cieśla, Ł; Kryszeń, J; Stochmal, A; Oleszek, W; Waksmundzka-Hajnos, M (2012). Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70: 126-135.
- Coleman, DC; Rinaldi, MG; Haynes ,KA; Rex, JH; Summerbell, RC; Anaissie, EJ; Li, A; Sullivan, DJ(1998) . Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 36 (1): 156-165.

- Colivet, J; Belloso, G; Hurtado, E (2006). Comparación del efecto inhibidor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 18(2): 168-173
- Conforti, F; Statti, G A; Menichin, F; Medina, M.B.(2011). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage *Food Chemistry*, 102: 1096–1104.
- Costa , L. M.; Moura, N. F.; Marangoni, C; Mendes, C. E.; Teixeira, A. O. (2009). Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.30: 51-59.
- Cruz-galvez, A.M; Aldapa-gómez, A; Villa gómez-ibarra, J.R; Chavarría-hernández, N; Rodrigues-baños, J. (2013) Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*. 32:289-295.
- Dastmalchi, K; Florest, G; Petrova, V; Pedraza-peñalosa, P; Kennelly, E (2011). Edible neotropical blueberries: antioxidant and compositional fingerprint analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (7): 3020-3026.
- Davis, C. B. (2007). Determination of capsaicinoids in Habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington DC, 55 (15): 5925-5933.
- Deepa, N; Kaura, C; George, B; Singhb, B; Kapoor, HC (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity.40 (1): 121-129.
- Degáspari, C. H.; Waszczyński, N.; Prado, M. R. M. (2005) Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências agrotécnicas*. 29:617-622.
- Ding, Z S; Jiang, F S; Chen, N P; LV, G Y; Zhu, C G. (2008). Isolation and identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules*, 13, 220-229.

- Dorantes, L; Colmenero, R; Hernandez,H; Mota,L; Jaramillo, M A; Fernandez,E; Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 57 (1–2): 125–128.
- Elzaawely, AA; Xuan, TD; Tawata, S (2005). Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* Houtt. aerial parts. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2225-2230.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa) - Hortaliças. www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.html. Acesso em 31 de agosto de 2015.
- Falcao, E.P.S; Silva, N.H; Gusmao, N.B; Ribeiro, S.M; Honda, N.K.;Pereira, E.C (2002). Atividade antimicrobiana de compostos fenolicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 21 (1) : 43-49.
- Filgueira, F (2008). Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3a ed. Viçosa: UFV, 421p.
- Forsythe, SJ. (2013). Microbiologia da Segurança dos alimentos. *Artmed*, 2ª edição, 375-378.
- Fu, L; Valentino, H R; Wang, Y. (2016) .Chapter 3 – Bacterial Contamination in Food Production. *Antimicrobial Food Packaging*, 35–43.
- Ghasemnezhad, M; Sherafati, M.; Payvast, G.A (2011): Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3:44-49.
- Gloria, L. L (2013) *Cucurbita moschata* (abóbora): Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Dissertação (Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 121 páginas.
- Gurnani, N; Gupta, M; Mehta, B.K. (2016). Natural Products: Source of Potential Drugs.*Journal of Taibah University for Science*, 10: 462–470.

- Harborne, J. B. (1989) General procedures and measurement of total phenolics. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. *Methodos plant biochemistry*, v.1: pant phenolics. (ed). London: Academic press.
- Hervert-hernández, D; Sáyago-ayerdi, S; 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(6): 3399-3406
- Howard, L. R. et al (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington DC, 48 (5) : 1713 - 1720.
- 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*, 11: 267–274.
- Koffi-nevry , R; Kouassi , K C; Nanga Z Y; Koussémon , M; Loukou, G Y (2012). Antibacterial Activity of Two Bell Pepper Extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* . *International Journal of Food Properties*, 15(5):961-971.
- Koleva, I.I; Van beek, T.A; Linssen, J.P.H; Groot, A; Evstatieva, L.N (2001). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Analysis*. 13, 8–17.
- Laer A E V; Lima, A S; Trindade, OS; Andriguetto, C ; Destro, MT; Silva, W P (2009). Caracterização de *Listeria monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento de lingüiça mista frescal em Pelotas-RS por PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(3).
- Lemos, G.C.S (1997) Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de espécies vegetais frente a bactérias de mastite bovina. Dissertação (Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 141p.
- Lemos, G C S; Oliveira, L O; Eberli, B. B; Vieira-da-motta, O; Folly, M. M.(2000). Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC and jaborandi-

- falso (*Piper aduncum* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* (Impresso), 3: 67-72.
- Li ,M ; Du, X; Villaruz, A E; Diep, BA; Wang, D; Song ,Y; Tian, Y; Hu, J; Yu, F; Lu, Y; Otto, M (2012). MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med.* 18 (5): 816-819.
- Lima, M R F; Ximenes, C P A; Luna, J S; Sant'ana, A E G (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16:300-6.
- Lou Q; Qi, Y; Ma, Y; Qu, D (2014). Two-Component Signal Transduction System SaeRS Positively Regulates *Staphylococcus epidermidis* Glucose Metabolism. *The Scientific World Journal*, 1-12.
- Maciel, R L; Moreira-campos, L M.; Silva, B C; Lins, M G; Brandão (2006). Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com Arnica Montana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1): 99-104.
- Mark, C; Enright, M; Robinson, A; Randle, G; Feil, E; Grundmann, H; Spratt, B.(2002). The evolutionary history of methicillin-resistat *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, 99 (4): 7687-7698.
- Matus, Z., Deli, J; Szabolcs, J. J. (1991). Carotenoid composition of yellow pepper during ripening-isolation of Bcryptoxanthin5,6-epoxide. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 39: 1907–1914.
- Menichini, F. (2009) .The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq cv. Habanero. *Food Chemistry*, Barking, 114 (2) : 553-560.
- Mendes, N S (2016). Validação de método para determinação de substâncias fenólicas em extrato de *Capsicum baccatum* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dissertação (Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 142 p.

- Medeiros, E S; Mota, R A; Santos, M V; Freitas, M F L; TELES, J A (2009). A Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29 (7): 569-574.
- Medina, M B (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*. 3(2): 79-87.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2004). Farmacopéia Brasileira. São Paulo: Atheneu,
- Mira, N.V M. ; Barros, R M C ; Schiocchet, M A ; Noldin, J A ; Lanfer-marquez, U M (2008). Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , Campinas, 28(4): 994-1002.
- Mittelstaedt, S; Carvalho, V. M. (2006). *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). *Revista instituto ciência saúde*, 24 (3):175-82.
- Monteiro, J M; Albuquerque, U P; Araújo, E L (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28(5): 892-896
- MOREIRA, DL (2000). Métodos de análise e dosagem de taninos condensados, taninos gálicos e fenóis totais. Apostila NPPN-UFRJ
- Muzitano, MF; Cruz, EA; Almeida, A P; Silva, SAG; Kaiser, C R, GUETTE, C, ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S. S. (2006) Quercetrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*. 72:81-83.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2010). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8th Edition.
- Navarro, JM; Flores, P; Garrido, C; Martinez, V (2006). Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96, 66–73.
- Neves, TS; Carpanezzi, A A; Zuffellato-ribas, K .C; Marengo,R. A (2006). Enraizamento de corticeira da serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (12) : 1699-1705.

- Nogueira, RJMC; Moraes, J.A. PV; Burity, H A; Silva junior, JF(2002) .Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *Pesquisa . agropecuária. brasileira*, Brasília, 37(4) : 463-470
- Ogiso, Y (2008). An antioxidant of dried chilli pepper maintained its activity through postharvest ripening for 18 months. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, 72 (12) : 3297-3300.
- Pereira, LS (2015). Peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *Capsicum annum* L.: caracterização atividade inibitória sobre microrganismos fitopatogênicos. Dissertação (Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Pereira, A C S; Moura, S M; Constant, P B L (2008). Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 29(2): 189-200.
- Pereira, M C; Vilela, G R; Costa; Martinez, L M A S; Fernandes, A F; Nascimento, E W; Piccoli, R H (2006). Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciências Agrotécnicas*. 30 (4): 731-738.
- Pinto, M S; Faria, J E; Message, D; Cassini, ST A; Pereira, C S; Gioso, M M (2001) Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38: 278-283.
- Polônio, M LT; Peres, F (2009). Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Caderno Saúde Pública*, 25(8):1653-1666.
- Ramalho, V C; Jorge, N (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29 (4) : 755-760.
- Ravishankar, K.; Kiranmayi, G.V.N; Appa reddy, G.V; Sowjanya, V.V.L; Sainadh, V.B; Durga, V.G.L; Prasad, V S; Swaminaidu, P.V; Prasad, T. (2012) Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2:86-91.

- Reis, F J C; Damaceno, N. (2007). Fibrose cística. *Revista Brasileira de Patologia Medicina Laboratorial*. 43 (6): 413-423.
- Ribeiro, C S C; Lopes, C. A; Carvalho, S. I. C; Henz, G. P; Reifschneider, F. J. B. (2008) *Pimentas Capsicum*, Brasilia, Embrapa Hortaliças. 153 p.
- Rich, M.; Deighton, L.; Roberts, L. (2005). Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet .Microbiology*, 111: 237-240
- Roginsky, V; Lissi, EA (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92, 235-254.
- Rodriguez-amaya, D. B .(2001) . A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, 64 p.
- Roesler, R; Malta, L G; Carrasco, L C; Holanda, R B; Sousa, C A S; Pastore, G M (2007).Atividade antioxidante de frutas do cerrado.*Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27(1): 53-60.
- Rosa, A; Ignazio, C; Tuberoso, G; Atzeria, A; Melisa, M P; Bifulco, E; Dessia, M A (2011). Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry*. 129 (3): 1045-1053.
- Sandasi, M; Leonard, C. M; Viljoen, A. M (2000). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1): 30-35.
- Santos, M. M. P. (2010). Atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais das especies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, e de analogos sinteticos da capsaicina, frente aos microrganismos da cavidade oral. Tese (Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 68 Páginas.
- Santos, A. L; Santos, D. O; Freitas, C. C; Ferreira, B. L. A; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R; Castro, H. C (2007). *Staphylococcus aureus*: Visiting a strain of clinical importance. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. 43:413-423.
- Silva, J. C; Porto, F R C (2012). Etnobotânica e uso medicinal da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) pelos horticultores e consumidores da horta comunitária da Vila Poty, *Revista FSA*, 9.

- Schito, A. M; Piatti, G; Stauder, M; Bisio, A; Giacomelli, E; Romussi, G; Pruzzo C.(2011). Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *Journal International of Antimicrobial Agents*, 37(2): 129-134.
- Shami, N. J. I. E; Moreira, E. A. M (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista Nutrição*. 17 (2): 227-236
- Shinohara, N K S; Barros, V. B.; Jimenez, S M C; Machado, E C L; Dutra, R A F; Filho, J L L (2008). *Samonella* spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos. *Revista Ciências & Saúde Coletiva*, 13 (5) : 1675-1683.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista Nutrição* , Campinas, 15(1):71-81.
- Soares, M; Welter, L; Kuskoski, E M ; Gonzaga, L ; Fett, R (2008). Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 30 (1) : 059-064.
- Souza, A C M (2005). Características físicas, físico-químicas, químicas e nutricionais do quipa (*Tacinga inamoena*).. Dissertação (Ciências dos Alimentos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 47 Páginas
- Sricharoen, P; Techawongstein, S; Chanthai, S. (2015). A high correlation indicating for an evaluation of antioxidant activity and total phenolics content of various chilli varieties. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 8077–8085.
- Stehmann, J.R; Mentz, L.A; Agra, M F; Vignoli-silva, M; Giacomini, L. (2010). Solanaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. . Acesso em 06 de Dezembro de 2015.
- Surh, YJ; Lee, E; Lee, JM. (2002). The capsaicin study. *Mutation Research* 41: 259-267.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl.. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (1998). Plant defenses:surface protectants and secondary metabolites. *Plant physiology*. Sunderland : Sinauer Associates, 347-376.

- Taguri, T; Takashi, T; Kouno, I. (2006) .Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Japão, 29 (11): 2226-2235.
- Tewksbury, J J; Nabhan, G P (2001). Seed dispersal: Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature*. 6845: 403-414
- Toledo, M C F; Esteves, W; Hartmann, E M (1985) Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 5: 1.
- Varea, S; García-vallejo, M C; Cadahía, E ; Simón, B. F. D (2001). Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 56–61.
- Vieira-Motta, O ; Folly, M M ; Sakyama, C C H (2001) . Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)*, 32: 27-31.
- Vieira-Motta, O (1997). Identificação do *Staphylococcus aureus*, associado á mastite subclínica bovina, através da técnica de reação da polimerase em cadeia(PCR) no Norte Noroeste do Estado do Rio de Janeiro.Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Campos dos Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF.
- Wiest, J M ; Carvalho, H H C; Avancini, C A M. ; Gonçalves, A R(2009). Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 29(3): 474-480.
- Wittschier, N.; Wittschier N; Lengsfeld C; Vortheims S; Stratmann U; Ernst JF; Verspohl EJ; Hensel A (2007). Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59 (6): 777-786.
- Yen, G C; Duh, P D (1994) . Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 629–632.
- Zerdin, K.; Rooney, M L; Vermue, J (2003). The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem.*82: 387-389.

Zimmer ,A R ;Leonardia, B; Miron , D; Schapovala, E; Oliveira, J R (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *Journal Ethnopharmacology*, 139: 228-233.

Zur, I A. (2011). A análise citológica do processo de infecção e as primeiras respostas de defesa induzidos em centeio de Inverno (*S. cereale* L.) mudas. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76: 189-19.