

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



**Dissertação**

**Variabilidade metabólica em pimentas (*Capsicum* spp.): destaque para  
capsaicinoides por CLAE/FL/EM/EM**

Tanize dos Santos Acunha

**Pelotas, 2013.**

TANIZE DOS SANTOS ACUNHA

**Variabilidade metabólica em pimentas (*Capsicum* spp.): destaque para  
capsaicinoides por CLAE/FL/EM/EM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

**Comitê de orientação: Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves  
Prof. Dr. Prof. César Valmor Rombaldi  
Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Lia Barbieri**

Pelotas, 2013.

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

A189v Acunha, Tanize dos Santos  
Variabilidade metabólica em pimentas (*Capsicum*  
spp.) : destaque para capsaicinoides por CLAE/FL/EM/EM  
/ Tanize dos Santos Acunha; Fábio Clasen Chaves,  
orientador. - Pelotas, 2013.  
72 f.: il.

Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos),  
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade  
Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Solenaceae. . 2.Capsaicinoides. 3.Pimenta.  
4.Metabólitos especializados. I. Chaves, Fábio Clasen,  
orient. II. Título.

CDD: 633.83

Catálogo na Fonte: Gabriela Machado Lopes CRB:10/1842  
Universidade Federal de Pelotas

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves - UFPel

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi - UFPel

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira - UFPel

Dr<sup>a</sup>. Juliana Castelo Branco Villela – Embrapa

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e a todos professores e colegas, que de alguma forma contribuíram com a minha formação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em todos os momentos;

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, ao Centro de Química Farmácia e Alimentos e a Embrapa Clima Temperado por possibilitar a realização deste trabalho;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao Prof. Fábio Chaves, pela valiosa orientação, pela paixão científica, pela amizade, por acreditar em mim, e por acompanhar cada passo, com conhecimento e objetividade. Deixo aqui minha gratidão e admiração;

Ao Prof. César Rombaldi, pelos ensinamentos e conhecimento transmitido;

Ao Prof. Rui Zambiasi e a Prof. Rosa Lia Barbieri pela colaboração no desenvolvimento do trabalho e conhecimento transmitido;

Ao Prof. Claudio Pereira, pela colaboração e disponibilidade de equipamentos para realização das análises;

Aos meus colegas do Laboratório de Metabolismo Secundário, Biotecnologia de Alimentos, Laboratório de Cromatografia de Alimentos e Laboratório de Grãos, não citarei nomes, pois são muitos;

A Rosane Crizel, ao Ícaro Tavares e ao Victor Iser pela ajuda na realização das análises, graças à vocês o desenvolvimento deste trabalho foi possível;

Ao secretário André, pela sua prontidão e disponibilidade em ajudar com toda a documentação necessária;

Aos meus pais Paulo e Rose, pelo amor, força, compreensão e pela base sólida que só uma família pode proporcionar. Sem dúvidas, a contribuição de vocês foi imprescindível para a execução deste trabalho;

Aos meus amigos Elisete e Rogério, pela amizade, força e pelos sábios conselhos;

Não caberão todos aqui, mas saibam que na memória sempre haverá lugar para lembrar de todos que de alguma forma contribuíram para essa história...

Muito obrigada!

*“O trabalho é a vocação inicial do homem,  
é uma bênção de Deus,  
e enganam-se lamentavelmente os que o  
consideram um castigo.”*

*Sulco, 482*

*“A sabedoria não nos é dada;  
É preciso descobri-la por nós mesmos,  
depois de uma viagem que  
ninguém pode  
nos poupar ou fazer por nós.”*

*Marcel Proust*

## Resumo

ACUNHA, Tanize dos Santos. **Variabilidade metabólica em pimentas (*Capsicum* spp.): destaque para capsaicinoides por CLAE/FL/EM/EM**. 2013.72f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas

No Brasil, o cultivo de pimentas é de grande importância, tanto pelas características de rentabilidade quanto pela importância social. Além disso, o país é considerado um importante centro de diversidade genética de pimentas do gênero *Capsicum*. Entretanto, grande parte dessa variabilidade está sendo perdida pela substituição de cultivos ou em consequência do êxodo rural. Com o objetivo de conservar, caracterizar e encontrar fontes de resistência a estresses bióticos e abióticos, a Embrapa mantém bancos ativos de germoplasma de *Capsicum*. Contudo, para que os genótipos conservados nos bancos de germoplasma se tornem disponíveis aos programas de melhoramento genético, os mesmos devem ser devidamente caracterizados. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar acessos de pimentas (*Capsicum* spp.) quanto às características físico-químicas e ao teor de metabólitos especializados. Para avaliação de capsaicinoides, um método de preparo de amostra e de quantificação por CLAE-FL foi otimizado e validado e os compostos foram confirmados por UHPLC-MS/MS. Os dados obtidos evidenciaram a ampla variabilidade dos frutos de pimentas, demonstrando o potencial uso da coleção do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado para o melhoramento genético. Dentre os acessos avaliados, os três que mais se destacaram quanto ao teor de compostos funcionais por grupo de compostos foram: P119, P302 e P189 com elevado teor de compostos fenólicos entre 225,16 e 243,47 mg equivalente de ácido gálico/100 gramas em base úmida; P287, P50 e P25, com maior potencial antioxidante entre 2,71 e 3,03 mmol equivalente Trolox/100mg em base úmida; P269, P280 e P179, com elevado teor de carotenoides entre 53,42 e 54,11 equivalente mg de  $\beta$ -caroteno/100 gramas em base úmida; e os genótipos P120, P246 e P236 com elevado teor de capsaicinoides entre 6132,00 e 19543,70 mg/100g em base seca. A avaliação dos capsaicinoides pela técnica UHPLC-MS/MS permitiu a confirmação inequívoca dos compostos avaliados por CLAE-FL e possibilitou a identificação de outros capsaicinoides

incluindo nonivamida, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina também presentes no extratos de *Capsicum*.

Palavras-chave: *Solanaceae*. pimenta. Metabólitos especializados.  
Capsaicinoides

## Abstract

ACUNHA, Tanize dos Santos. **Metabolic variability in peppers (*Capsicum* spp.): featuring capsaicinoids by HPLC/FL/MS/MS.** 2013. 72f. Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas

Pepper cultivation in Brazil, is of major importance, for economic and social aspects. In addition, Brazil is considered an important genetic diversity center of *Capsicum* pepper. However, much of this variability is been lost due to crop substitution or in consequence of rural exodus. With the objective of keeping, characterizing and finding sources of biotic and abiotic resistance, Embrapa has active *Capsicum* germplasm collections. For instance, in order to have these accessions of the collection available for breeding programs they need to be properly characterized. In this context, this work had the objective of characterizing pepper accessions regarding their physico-chemical characteristics and specialized metabolite content. The parameters evaluated were pH, soluble solids content, total titratable acidity, color, phenolic compound content, carotenoid content, antioxidant potential and capsaicinoid content. For capsaicinoid content evaluation, a method for sample preparation and analysis by CLAE-FL was optimized and validated and compounds confirmed for UHPLC-MS/MS. The data presented here shows large variation among genotypes, demonstrating the potential of this *Capsicum* collection to be used in breeding programs for the development of cultivars. Among the accessions, three that stood out the content of functional compounds by group of compounds were: P119, P302 and P189 with a high content of phenolic compounds between 225.16 and 243.47 mg acid equivalent galic/100 grams; P287, P50 and P25, with higher antioxidant potential between 2.71 and 3.03 mmol equivalent Trolox/100mg; P269, P280 and P179, with a high content of carotenoids between 53.42 and 54.11 equivalent mg  $\beta$ -caroten/100 grams, and the genotypes P120, P246 and P236 with high levels of capsaicinoids between 6132.00 and 19543.70 mg/100g. Capsaicinoid content were identified. Capsaicinoid evaluation using UHPLC-MS/MS allowed for the unequivocal confirmation of the identity of the compounds and permitted the identification of other capsaicinoids including nonivamide,

nordihydrocapsaicin, homocapsaicin and homodihydrocapsaicin in *Capsicum* spp. extracts.

Key words: *Solanaceae*. Pepper. specialized metabolites. Capsaicinoids.

## Lista de figuras

Figura 1	Estruturas químicas dos principais grupos de compostos fenólicos.....	22
Figura 2	Estruturas químicas dos principais carotenoides presentes em <i>Capsicum</i> .....	24
Figura 3	Via de biossíntese da capsaicina em <i>Capsicum</i> mostrando as principais enzimas e intermediários.....	26
Figura 4	Estrutura dos principais capsaicinoides e capsinoides presentes em <i>Capsicum</i> .....	28
Figura 5	Mecanismos de ação de antioxidante primário.....	30
Figura 6	Estrutura química dos antioxidantes tocoferol, luteolina e butilhidroxitolueno (BHT).....	31
Figura 7	Estrutura química do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	32
Figura 8	pH, teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (AT) e tonalidade (°Hue) de 72 acessos de pimentas ( <i>Capsicum</i> spp.).....	41
Figura 9	Correlação entre o potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos.....	43
Figura 10	Teor de compostos fenólicos totais, potencial antioxidante e carotenóides totais de 51 acessos de pimentas ( <i>Capsicum</i> spp.).....	45

Figura 11	Comparação do potencial de extração dos capsaicinóides entre metanol e acetonitrila.....	48
Figura 12	Média da área dos picos de capsaicina e dihidrocapsaicina em função do tempo de sonicação do extrato.....	49
Figura 13	Teor de capsaicina e dihidrocapsaicina de 40 acessos de pimentas ( <i>Capsicum</i> spp.).....	51
Figura 14	Correlação entre o potencial antioxidante e o teor de capsaicinóides totais.....	52
Figura 15	Cromatograma de íons totais e cromatograma de íons extraídos do genótipo P61.....	54
Figura 16	Cromatograma dos padrões capsaicina e dihidrocapsaicina (traço azul) e genótipo P61 (traço preto) analisados por detector de fluorescência.....	55
Figura 17	Espectro de massa experimental e teórico, respectivamente, da nonivamida, capsaicina e dihidrocapsaicina.....	57
Figura 18	Espectro de massa experimental e teórico, respectivamente, da dihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina.....	58

## Lista de tabelas

Tabela 1	Acessos avaliados e respectivas espécies.....	30
Tabela 2	Características físico-químicas de 72 acessos de pimentas agrupados por espécie.....	39
Tabela 3	Compostos fitoquímicos de 51 acessos de pimentas agrupados por espécie.....	42
Tabela 4	Parâmetros das curvas analíticas de capsaicina e dihidrocapsaicina analisadas por CLAE com detector de fluorescência.....	46
Tabela 5	Conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina de 40 acessos de pimentas ( <i>Capsicum</i> spp.).....	50
Tabela 6	Quantificação relativa dos capsaicinoides dos genótipos P28 e P61 identificados por UHPLC-MS/MS .....	56

## Sumário

1	Introdução geral.....	17
1.1	Objetivos.....	18
2	Revisão da literatura.....	19
2.1	<i>Capsicum</i> spp.....	19
2.2	Metabólitos especializados presentes em <i>Capsicum</i> spp.....	20
2.2.1	Compostos fenólicos.....	21
2.2.2	Carotenóides.....	23
2.2.3	Capsaicinoides.....	25
2.2.3.1	Análise de capsaicinoides.....	28
2.2.4	Potencial antioxidante.....	30
3	Material e Métodos.....	32
3.1	Material vegetal.....	32
3.2	Avaliações físico-químicas.....	35
3.2.1	Sólidos solúveis totais.....	35
3.2.2	Acidez total titulável.....	35
3.2.3	Cor da epiderme.....	35
3.2.4	Teor de compostos fenólicos totais.....	35
3.2.5	Teor de carotenoides totais.....	36
3.2.6	Potencial antioxidante.....	36
3.2.7	Otimização do método para avaliação de capsaicinoides.....	35
3.2.8	Otimização de extração de capsaicinoides com uso de ultrassom...	37
3.2.8.1	Método aplicado para avaliação dos capsaicinoides por CLAE-FL...	37
3.2.9	Método aplicado para avaliação de capsaicinoides por UHPLC- MS/MS.....	38
3.3	Análise estatística de dados.....	37
4	Resultados e Discussão.....	39
4.1	Avaliação físico-química.....	39
4.2	Otimização e validação do método para avaliação de capsaicinoides.....	46
4.2.1	Curvas de calibração e figuras de mérito.....	46
4.2.2	Otimização do solvente extrator e tempo de sonicação.....	47
4.3	Avaliação dos capsaicinoides.....	49

4.3.1	Avaliação dos capsaicinoides por CLAE-FL.....	49
4.3.2	Avaliação de capsaicinoides por UHPLC-MS/MS.....	52
5	Considerações finais.....	59
6	Referências.....	62

## 1. Introdução geral

Uma das principais características culturais das tribos indígenas que habitavam as terras brasileiras na época do descobrimento era o cultivo de pimentas. Após o descobrimento, os navegadores perceberam que as pimentas utilizadas pelos nativos eram mais picantes (pungentes) que as pimenta-do-reino ou pimenta-negra do gênero *Piper*, sendo assim, incluíram em suas especiarias as pimentas do gênero *Capsicum* e as disseminaram em vários locais como África, Europa e Ásia (REIFSCHNEIDER, 2000).

Estas pimentas mais pungentes pertencem à família Solanaceae e se desenvolvem como um arbusto perene em regiões tropicais do mundo (BAE et al., 2012). O gênero *Capsicum* spp. possui de 20 a 25 espécies, sendo cinco delas (*Capsicum annum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens*) as principais espécies domesticadas e cultivadas comercialmente (BAE et al., 2012; CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

Nos últimos anos, o interesse pelas espécies deste gênero tem aumentado significativamente, de 2002 a 2006 seu consumo aumentou 18% em nível mundial (McCARTY, 2008). No Brasil, a demanda do mercado nacional e o volume de exportações de pimentas (*Capsicum* spp.) também aumentaram, fato que fez com que este produto se tornasse uma das dez hortaliças mais importantes do país e se posicionasse como uma das principais hortaliças exportadas (RIBEIRO et al., 2008).

O aumento na demanda repercutiu na produção, com cultivos em regiões de clima subtropical como no Sul, ou tropical como no Norte e Nordeste. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (RUFINO; PENTEADO, 2006).

O cultivo de pimenta no Brasil é de grande importância, tanto pelas características de rentabilidade quanto pela importância social (RUFINO; PENTEADO, 2006), em muitos casos é a principal fonte de renda familiar (RIBEIRO et al., 2008). No entanto, esse cultivo ainda é feito com baixo nível tecnológico e os produtores e processadores carecem de informações. Em algumas regiões, como no Sul do país, em virtude de problemas relacionados à dificuldade de atender exigências vigentes para comercialização e incidências de doenças na produção, tem ocorrido uma redução no plantio de pimenta (BARBIERI et al., 2011).

Dessa forma fica evidente a necessidade da realização de estudos de seleção de novas cultivares que associem resistência às pragas e doenças, qualidade e produtividade, principalmente para atender o processamento industrial. Entretanto, para que haja maior uso desses recursos é de fundamental importância o conhecimento da composição química dessas variedades crioulas de pimentas e a organização dos dados referentes a variabilidade dos constituintes.

### **1.1. Objetivos**

#### a) Objetivo

Caracterizar acessos de pimentas (*Capsicum* spp.) quanto as características físico-químicas e teor de metabólitos especializados com potencial funcional, com ênfase para os metabólitos responsáveis pela pungência (capsaicinoides).

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. *Capsicum* spp.

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e possui de 20 a 30 espécies, sendo cinco delas (*Capsicum annuum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens*) as principais espécies domesticadas e cultivadas comercialmente (BAE et al., 2012; CARVALHO; BIANCHETTI, 2008).

No mundo das especiarias, observa-se que o mercado de *Capsicum* está em plena expansão. A produção de pimenta vem crescendo de forma exponencial nos últimos trinta anos e somente em 2011 a produção mundial alcançou 1,8 milhão de hectares, com mais de 29 milhões de toneladas colhidas (FAO, 2013).

No Brasil, a demanda do mercado nacional e o volume de exportações de pimentas (*Capsicum* spp.) também aumentaram, fato que fez com que este produto se tornasse uma das dez hortaliças mais importantes do país e se posicionasse como uma das principais hortaliças exportadas (RIBEIRO et al., 2008). O aumento na demanda repercutiu na produção, com cultivos em regiões de clima subtropical como no Sul, ou tropical como no Norte e Nordeste. Os principais Estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. O cultivo de pimenta no Brasil tornou-se de grande importância, não somente pelas características de rentabilidade mas também pela importância social visto que em muitos casos é a principal fonte de renda familiar (RIBEIRO et al., 2008; RUFINO; PENTEADO, 2006).

Por ser o Brasil um importante centro de diversidade genética do gênero *Capsicum*, há alguns anos a variabilidade de pimentas *Capsicum* tem sido conservada em bancos de germoplasma de diferentes instituições tais como, Centro Tecnológico da Zona da Mata (CTZM), a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), a Embrapa Hortaliças e Embrapa Clima Temperado (MONTEIRO, 2008; REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008).

Os bancos de germoplasma são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro e são criados com a finalidade de manejar a variabilidade genética entre e dentro da espécie, com fins de utilização para a pesquisa em geral, especialmente para o melhoramento genético (VEIGA, 1999). Uma das principais finalidades do melhoramento genético é a

obtenção de variedade que, além de produtivas, possuam tolerância a estresses bióticos e abióticos, e apresentem elevado teor de compostos funcionais, com importância para a saúde dos consumidores (NEITZKE, 2012). De acordo com Votava et al. (2002) a variação genética encontrada dentro de parentes silvestres de espécies domesticadas é importante para a melhoria e a obtenção de cultivares tolerantes a estresses bióticos abióticos. Além da conservação, uma das principais atividades dos Banco Ativos de Germoplasma é realizar a caracterização e a avaliação do germoplasma.

O Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum*, criado desde 2003, na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas no Rio Grande do Sul, tem como objetivo conservar as variedades crioulas de pimentas cultivadas pelos agricultores no Sul do Brasil (NEITZKE et al., 2008).

As pimentas são usadas como condimentos (DUARTE et al., 2004), na forma de conservas, extratos concentrados denominados oleoresinas, em pó (REIFSCHNEIDER, 2000), corantes (CAREAGA et al., 2003), ou ainda como flavorizante (DOYMAZ; PALA, 2002). Além da importância culinária, também são empregadas como produto da indústria bélica, na confecção de “pepper spray” e “pepper foam” fabricados a partir da oleoresina (REIFSCHNEIDER, 2000), assim como na composição de medicamentos (DUARTE et al., 2004). As espécies *Capsicum* apresentam uma ampla variedade de compostos bioativos e tem sido empregadas com finalidades etnofarmacológicas, como em tratamento terapêutico para dores, regulação da temperatura corporal, tratamentos anti-obesidade, em terapia anticancerígena, como agente antioxidante, agente antimicrobiano, entre outros (MEGHAVANSI et al., 2010).

## **2.2. Metabólitos especializados presentes em *Capsicum***

Frutos de *Capsicum* são uma importante fonte de carotenóides (alguns deles com atividade pró-vitamina A), flavonóides, ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferóis (vitamina E) (HOWARD; WILDMAN, 2007). A quantidade e composição desses metabólitos apresenta grande variação em função da espécie, variedade, localização geográfica, estágio de desenvolvimento, sistema de cultivo e método de processamento (GUERRA et al., 2011).

A presença de alguns destes metabólitos funciona como mecanismo de defesa contra estresses bióticos e abióticos (SCHULZE; SPITELLER, 2009). Em pimentões, por exemplo, o ácido ascórbico é produzido com o objetivo de proteger a planta contra o distúrbio fisiológico causado por estresse ambiental, como a deficiência de cálcio conhecida como podridão apical (ALONI et al., 2008). Park et al. (2012) observaram a indução de produção de polifenóis em *C. annuum* infectados com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose, principal patógeno da pimenta *Capsicum*. Schulze e Spiteller (2009) sugerem que a capsaicina é produzida como um mecanismo de defesa contra animais frugívoros e outros autores sugerem que o estresse hídrico também afeta a via de biossíntese dos fenilpropanóides e promove o acúmulo de capsaicinóides (SUNG et al., 2005; ESTRADA et al., 1999). Também foi observado o aumento da concentração de vitamina C em espécies de pimentas tratadas com ácido salicílico (ELWAN; EL-HAMAHMY, 2009).

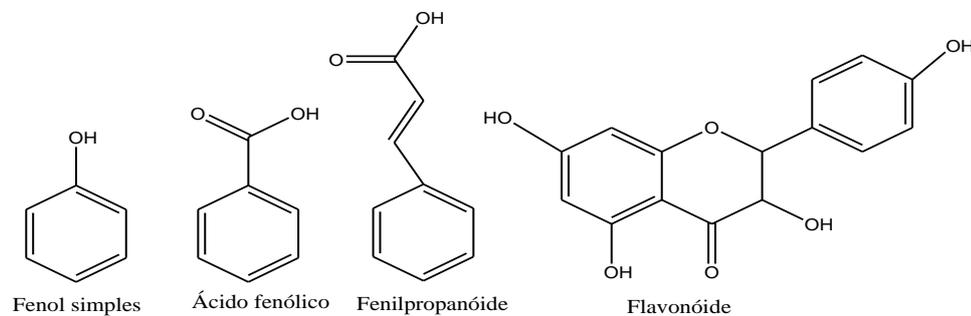
Além de ser uma importante forma de proteção para planta, esses compostos também apresentam diversos benefícios ao organismo humano (TOPUZ e OZDEMIR, 2007; WAHYUNI et al., 2011; BAE et al., 2012; JEONG et al., 2011).

### 2.2.1. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Derivam do metabolismo especializado, mais especificamente da via do ácido chiquímico e do acetato (RYAN et al., 1999). São sintetizados nos cloroplastos ou no citoplasma e após a glicosilação são transportados e acumulados dentro dos vacúolos ou excretados no apoplasto, onde permanecem dentro da parede da célula ou incorporados a cutícula (SOLOVCHENKO, 2012). Essas substâncias desempenham um papel importante no crescimento e na reprodução, fornecendo proteção contra patógenos e predadores além de contribuir para a cor e características sensoriais de frutas e vegetais (BOROCHOV-NEORI et al., 2009).

Compostos fenólicos incluem fenóis simples, ácidos fenólicos, fenilpropanóides e flavonóides (Figura 1). Os ácidos fenólicos são compostos que possuem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais

grupamento metoxila ou hidroxila na molécula. Os flavonóides são constituídos de dois anéis aromáticos A e B unidos por um anel heterocíclico (anel C) com três carbonos. Dentro do grupo dos flavonóides variações no anel C resultam em diferentes classes de compostos que incluem, flavanóis, isoflavonas, flavonas, antocianidinas (AJILA et al., 2011). O conjunto dos compostos fenólicos apresentam uma série de propriedades benéficas à saúde, tais como: antialérgicos (CHUNG; CHAMPAGNE, 2008), antimicrobianos, antioxidantes (VISWANATH et al., 2009), antitrombótico, anti-inflamatórios, vasodilatadores, dentre outras (SINGH et al., 1999).



**Figura 1-** Estruturas químicas dos principais grupos de compostos fenólicos.

Quercetina, luteolina e kaempferol são os principais flavonóides encontrados em pimentas (LEE; HOWARD; VILLALON, 1995; BAE et al., 2012) enquanto miricetina e apigenina também são relatados, mas em menor concentração (BAE et al., 2012). Ao avaliarem cinco variedades de *Capsicum* sp., Metereska e Peruca (2005) observaram a presença de ácido ferúlico e sináptico como os principais compostos fenólicos em frutos maduros e a quercetina nos frutos imaturos. Além dos compostos citados anteriormente, também já foi relatada a presença de ácido protocatecuico, clorogênico e cumárico em algumas variedades (SHWEIGGERT et al., 2006). Contudo, a maioria destes compostos encontram-se ligados a moléculas de açúcares. Sendo a glicose o açúcar mais comum, seguido pela galactose, raminose, xilose e arabinose (CORRADINI et al., 2011).

A pimenta ocupa um dos primeiros lugares no ranking de vegetais com elevada concentração de compostos fenólicos, sendo superior ao observado em espinafre, brócolis, alho, dentre outros vegetais (CHUN et al., 2005; KEVERS et al., 2007). Entretanto, vários são os fatores que influenciam a concentração

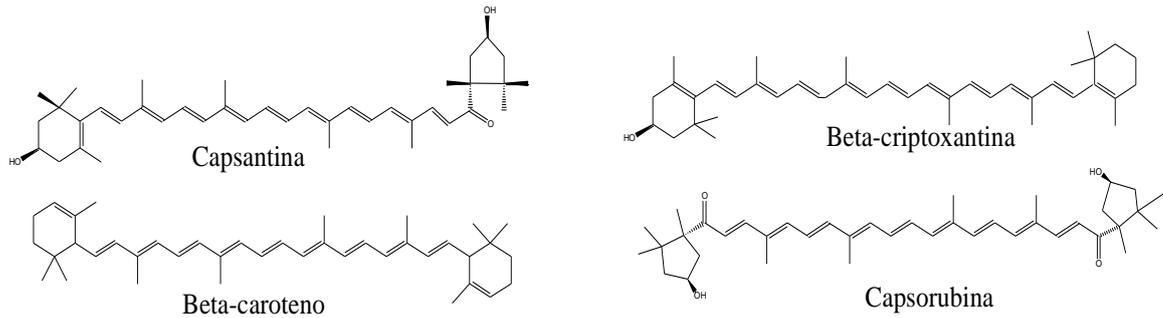
destes compostos, como espécie, estágio de desenvolvimento, localização geográfica, clima, estresses, sistema de cultivo, dentre outros (GUERRA et al., 2011).

O método mais comumente utilizado para estimar o teor de compostos fenólicos totais é o método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Swain e Hills 1959). Este método fundamenta-se em reações de oxirredução, mais especificamente na capacidade de redução dos compostos fenólicos, em meio alcalino, na qual uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico de coloração amarelada (forma oxidada), passa a complexos molibidênio-tungstênio de cor azul (forma reduzida). O número de hidroxilas ou compostos potencialmente oxidáveis controla a intensidade da cor gerada (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

#### 2.2.2. Carotenóides

Os carotenóides são compostos tetraterpenóides, que apresentam como estrutura básica uma cadeia de oito unidades isoprenicas (DUTTA et al., 2004). São sintetizados e acumulados nos plastídeos e servem como pigmentos acessórios na fotossíntese, facilitam a dispersão do pólen e atuam como removedores de radicais livres, protegendo o aparato fotossintético da fotoxidação (OLIVER et al., 1998).

Em *Capsicum* os carotenoides são os principais compostos responsáveis pela cor dos frutos (DUARTE et al., 2004). Mais de trinta diferentes estruturas de carotenóides já foram identificadas em frutos de pimenta (DELI et al., 2001). Dentre esses, se encontra em maior proporção a capsantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno, capsorubina (Figura 2), zeaxantina e a anteraxantina (WAHYUNI et al., 2011). Os principais carotenóides responsáveis pela cor de frutos vermelhos são três xantofilas presentes exclusivamente em *Capsicum*, a capsantina, capsorubina e capsantina-5,6-epóxido (RUSSO, 2011), enquanto que violaxantina e o  $\beta$ -caroteno, são os principais pigmentos em frutos de coloração laranja (GROSS, 1991).



**Figura 2-** Estruturas químicas dos principais carotenóides presentes em *Capsicum*.

A capsantina é um carotenóide oxigenado responsável por até 80% da concentração total de carotenóides em frutos vermelhos (DELLI et al., 2012). A forma esterificada das xantofilas tem grande estabilidade quando comparada com a forma livre (WEISSENBERG et al., 1997) e é a forma mais comumente encontrada nos frutos maduros (WAHYUNI et al., 2011; MÍNGUEZ-MOSQUERA e HORNERO-MÉNDEZ, 1993).

A cor do fruto vai depender da capacidade de sintetizar carotenóides e da retenção dos pigmentos clorofílicos (COLLERA-ZÚÑIGA et al., 2005). As cores observadas variam entre verde, vermelho, amarelo, marrom, laranja, salmão e roxo, a grande maioria derivados dos carotenóides, exceto os frutos de coloração roxa. Neste caso, são as antocianinas os compostos responsáveis por esta coloração (LIGHTBOURN et al., 2008).

O gênero *Capsicum* é uma das maiores fontes de carotenóides entre os vegetais (PALEVITCH; CRAKER, 1995). Os frutos maduros de diferentes variedades de pimentas apresentam altas concentrações destes compostos (MÍNGUEZ-MOSQUERA e HORNERO-MÉNDEZ, 1993), entretanto a quantidade e composição varia de acordo com a espécie, variedade, época do ano e grau de maturação (OLIVER et al., 1998).

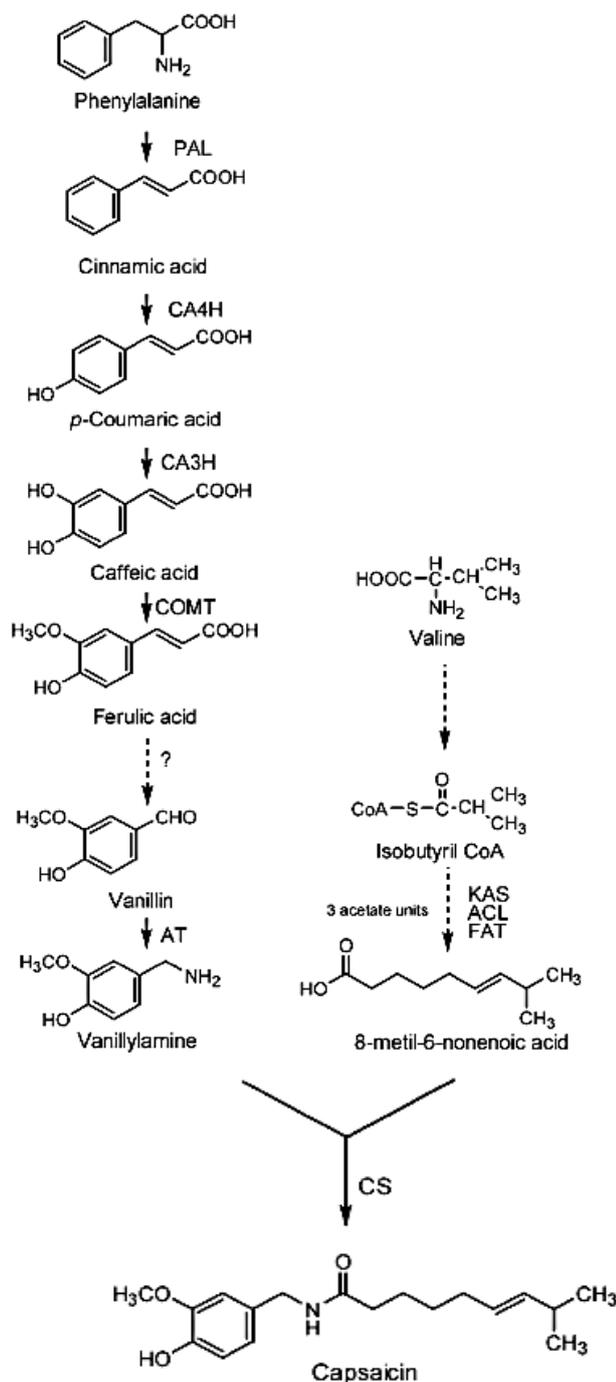
Além da atividade provitamina A de alguns destes compostos, eles também estão relacionados à capacidade antioxidante, ao aprimoramento do sistema imunológico, redução do risco de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, entre outras (DUTTA et al., 2004). De acordo com Mínguez-Mosquera e Hornero-Méndez (1993) o aparecimento de alguns tipos de câncer está relacionado à falta carotenóides oxigenados (xantofilas) na dieta. A zeaxantina, carotenóide oxigenado presente em pimentas, atua na prevenção da

degeneração macular relacionada a idade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), e a luteína e a  $\beta$ -criptoxantina apresentam atividade antitumoral (COLLERA-ZÚÑIGA et al., 2005).

Devido à estrutura complexa e a diversidade desses compostos, na literatura são encontrados diferentes métodos de extração (QUIRÓS; COSTA, 2006). Diferentes solventes ou misturas de solventes podem ser empregados para extração de carotenóides, entre eles os mais comuns são hexano, éter de petróleo, tolueno, acetona, metanol e etanol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Entretanto, o solvente ideal para esse processo irá depender da complexidade da matriz e a proporção em que os diferentes carotenóides se encontram no meio. É comum realizar também uma etapa de saponificação para remoção de clorofilas e lipídios que possam interferir nos procedimentos de extração. A saponificação é feita utilizando-se uma solução de base, como hidróxido de potássio, em solvente polar, como metanol ou etanol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MARINOVA; RIBAVORA, 2007). A estrutura com duplas ligações conjugadas caracterizam os carotenóides como cromóforos, o que permite que esses compostos sejam identificados e quantificados pelo uso da técnica de espectrofotometria (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A capsantina apresenta um amplo espectro de absorvância (400-520nm), com absorvância máxima em 460 e 480nm dependendo do solvente (ZECHMEISTER; POLGAR, 1943).

### 2.2.3. Capsaicinoides

Os capsaicinoides são alcalóides presentes apenas em frutos de *Capsicum* (REIFSCHNEIDER, 2000). Esses metabólitos especializados são produzidos pela reação de condensação entre a vanililamina, proveniente da via dos fenilpropanóides, e ácidos graxos C9-C11 ramificados, derivados da valina e leucina. São sintetizados e acumulados, em grande parte, nas vesículas ou vacúolos das células epidérmicas da placenta e transportados para fora das células da epiderme e armazenados nas vesículas da placenta, também chamadas de "blisters" (DÍAZ et al., 2004). De forma geral, esses compostos diferem quanto ao tamanho da cadeia, ao grau de insaturação ou ramificações e estão associadas aos ácidos graxos que entram na sua via biossintética (Figura 3) (ZEWDIE e BOSLAND, 2000; DUARTE et al., 2004).

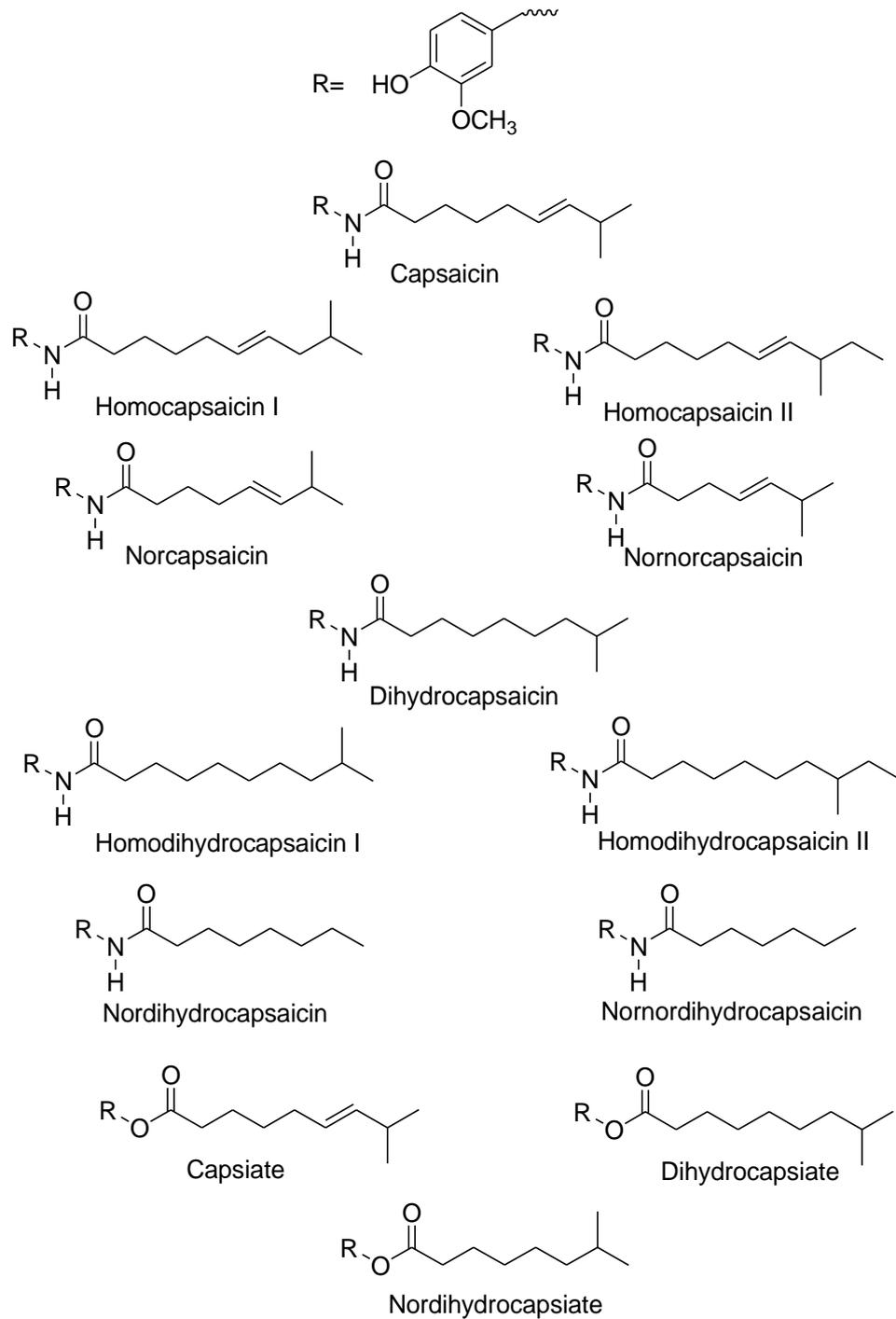


**Figura 3-** Via de biossíntese da capsaicina em *Capsicum* mostrando as principais enzimas e intermediários. PAL, Fenilalanina amônio-liase; CA4H, ácido cinâmico 4-hidroxilase; CA3H, Ácido cumárico 3-hidroxilase; COMT, Ácido cafeico O-metiltransferase; AT, Aminotransferase; KAS,  $\beta$ -cetoacil sintase; ACL, Proteína transportadora acil, FAT, Tioesterase ácido graxo, CS, Capsaicina sintase. Flechas quebradas indicam várias etapas. Ponto de interrogação indica etapas ainda que não estão bem caracterizadas. Fonte: Díaz et al., 2004.

Os capsaicinoides são responsáveis pela pungência, característica sensorial da pimenta que mais se destaca. A sensação de pungência é percebida pelos mamíferos como resultado da interação destas substâncias com receptores nervosos de calor e dor da pele e mucosas que desencadeiam vários processos fisiológicos. Dentre eles a mais evidente é a sensação de “queimação” e frente a herbívoros serve como defesa natural (TEWKSBURY; NABHAN, 2001).

Mais de 20 capsaicinoides já foram identificados em pimentas *Capsicum*, dentre os quais a capsaicina e a diidrocapsaicina (Figura 4) são as mais pungentes e perfazem aproximadamente 90% do total de capsaicinoides (TOPUZ; OZDEMIR, 2007). Existem os capsaicinoides menos pungentes como a homocapsaicina I e II, norcapsaicina, nornorcapsaicina, homodrihidrocapsaicina I e II, nordiidrocapsaicina, nornordiidrocapsaicina e também os capsaicinoides não pungentes como  $\omega$ -hidroxicapsaicina (OCHI et al., 2003) e um grupo de substâncias não pungentes semelhantes aos capsaicinoides, chamado capsinóide. Os capsinóides são provenientes da mesma via biossintética que os capsaicinoides, apresentam um núcleo vanílico ligado a um ácido graxo, entretanto diferentemente dos capsaicinoides, que estão ligados através de uma ligação amida, estes estão ligados através de um éster ao ácido graxo (Figura 4). Esses análogos ao capsaicinoides são denominados capsiato, diidrocapsiato e nordiidrocapsiato (Figura 4) (KOBATA et al., 1998).

Além de grande importância para qualidade sensorial das pimentas (pungência), os capsaicinoides também possuem um amplo espectro de propriedades biológicas como atividade antimutagênica, antitumoral, antioxidante, analgésica, ativadores do metabolismo, supressores do acúmulo de gordura (ZIMMER et al., 2011), propriedades antiinflamatórias, efeito quimiopreventivo (SURH; LEE; LEE, 2002), efetivos no tratamento de um número de desordens de fibras nervosas, incluindo dor associada com cistite, artrite e neuropatia diabética (NUEZ, 1995).



**Figura 4-** Estrutura dos principais capsaicinoides e capsinóides presentes em *Capsicum*.

#### 2.2.3.1. Análise de capsaicinoides

Na literatura existem relatos de diferentes metodologias de identificação e quantificação de capsaicinoides. Em 1912, Wilbur Scoville fez uma série de diluições de pimentas em água até que a pungência não fosse mais identificada quando avaliada sensorialmente por um grupo de pessoas. O número de diluições

necessárias para que a pungência não fosse mais perceptível foi adotada para construir a escala de pungência, ou seja, uma amostra com valor de 10.000 indica que foi necessário diluir dez mil vezes para que a pungência não fosse mais percebida. Assim, era possível avaliar a pungência das pimentas de forma subjetiva.

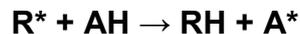
Posteriormente, diferentes métodos de extração para a avaliação destes compostos foram desenvolvidos. Metanol (WAHYUNI et al., 2011; ANTONIOUS et al., 2009; CHINN et al., 2011), etanol (MENICHINI et al., 2009) e acetonitrila (COLLINS et al., 1995; SINGH et al., 1999; PINO et al., 2007) são os solventes mais utilizados e geralmente são aplicados em conjunto com a técnica de ultrassom (WAHYUNI et al., 2011) ou aquecimento (CHINN et al., 2011), com o objetivo de facilitar e/ou melhorar a extração. Para identificação e quantificação é feito o uso de diferentes técnicas analíticas, dentre elas a espectrofotometria (DAVIS et al., 2007; SADASIVAM E MANIKKAM, 1992), eletroforese capilar micelar (MEKC) (MONNERVILLE, 1999), cromatografia líquida de alta resolução (CLAE ou HPLC - para sigla em inglês) (COLLINS et al., 1995; WAHYUNI et al., 2011; MENICHINI et al., 2009), cromatografia gasosa (CG ou GC - para sigla em inglês) (MENICHINI et al., 2009) e a espectroscopia de massas (EM ou MS - para sigla em inglês) normalmente acoplada a uma técnica cromatográfica (MANIRAKIZA et al., 1999; LIU et al., 2011).

Dentre as recentes técnicas desenvolvidas para análises de moléculas como os capsaicinoides, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada a espectrometria de massas de alta resolução reúne vantagens como rapidez, baixo consumo de solventes e maior eficiência (MALDANER et al., 2009), com a alta sensibilidade e exatidão para análise da fórmula molecular principalmente com a utilização de um detector geminado quadrupolo/tempo de voo (CROTTI et al., 2006).

Entretanto, além de uma técnica analítica precisa e exata também é necessário a avaliação da eficiência do método aplicado para análise. Para avaliar a eficiência de um método desenvolvido, adaptado ou implementado em um laboratório é necessário realizar o processo de validação. Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem sensibilidade, especificidade/seletividade, recuperação, estabilidade, intervalo de trabalho, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (LANÇAS, 2004).

#### 2.2.4. Potencial antioxidante

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre, cloro, complexo de metais de transição e a remoção destes pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante é comumente definido como estresse oxidativo (RAHMAM; BISWAS; KODE, 2006). Essas espécies incluem radicais ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $NO^{\cdot}$ ), espécies intermediárias neutras ou carregadas ( $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ) e outras espécies capazes de formar radicais livres ( $^1O_2^*$ ,  $O_3$ , Fe, Cu) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As substâncias capazes de inibir os processos oxidativos biológicos são denominados antioxidantes (Figura 5) e muitos desses compostos são formados naturalmente em vegetais.



**Figura 5-** Mecanismo de ação de antioxidante primário. R\*- radicais livres, AH- antioxidante com um átomo de hidrogênio e A\*- radical inerente.

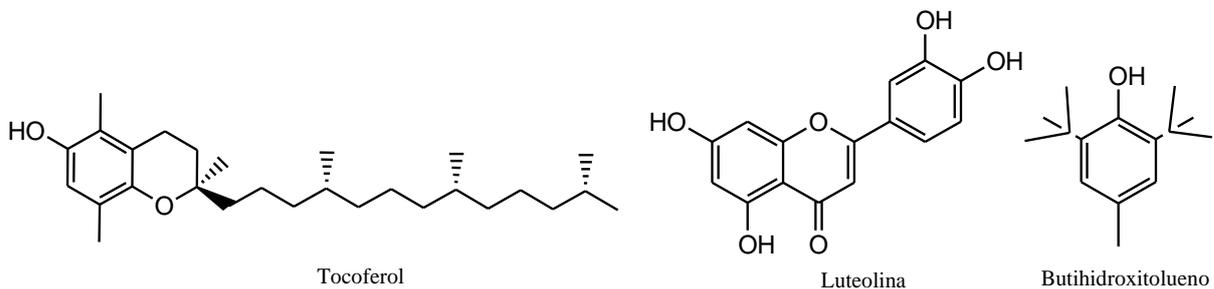
Pimentas *Capsicum* são fonte importante de algumas dessas substâncias antioxidantes, como compostos fenólicos, ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides (provitamina A) e capsaicinóides (MAZIDA et al., 2005; WAHYUNI et al., 2011).

As propriedades antioxidantes dos polifenóis estão relacionadas, principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores do oxigênio singlete (RICE-EVANS et al., 1996). Esses compostos também possuem a capacidade de complexação de íons metálicos, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio e modulação de vias sinalizadoras celulares (RAHMAM; BISWAS; KODE, 2006). Além dos flavonóides, outros compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante também já foram identificados em *Capsicum*, como ácido ferúlico, ácido sináptico (METERESKA; PERUCA, 2005), ácido protocatecuico, clorogênico e cumárico (SHWEIGGERT et al., 2006).

Os carotenóides também são importantes antioxidantes presentes em pimentas. Os principais mecanismos de ação antioxidante dos carotenóides ocorrem pela desativação do oxigênio singlete e pelo sequestro de radicais peroxila (DUTTA

et al., 2004). Howard et al. (2000), ao quantificarem carotenóides presentes em frutos imaturos e maduros de espécies do *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, constataram que no decorrer da maturação dos frutos ocorreu um aumento simultâneo das concentrações de  $\beta$  e  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno, capsantina e zeaxantina e concomitantemente o aumento do potencial antioxidante dos extratos destes frutos.

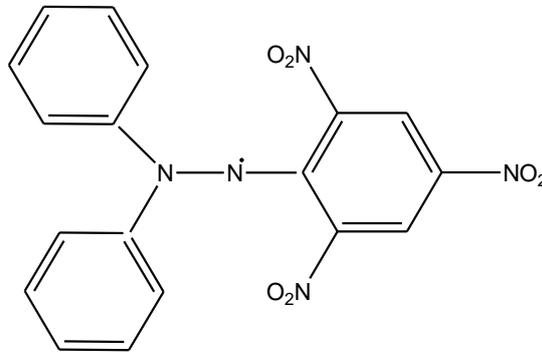
Os capsaicinoides também constituem importante potencial antioxidante. Em estudo realizado por Rosa et al. (2002), foi observado que os capsaicinoides apresentaram a capacidade de inibição da peroxidação dos lipídios com desempenho comparável ao tocoferol, a luteolina e o butilhidroxitolueno (BHT) (Figura 6). De acordo com Stahl e Sies (2005), as vitaminas E, C e A, são mais uma classe de compostos presentes em *Capsicum* com propriedades antioxidantes, que juntas apresentam efeito sinérgico e promovem a eliminação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio gerados durante o processo metabólico.



**Figura 6-** Estrutura química dos antioxidantes tocoferol, luteolina e butilhidroxitolueno (BHT).

Dentre os métodos aplicados para avaliação do potencial antioxidante, o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é um dos mais utilizados. Este método fundamenta-se na capacidade que os compostos possuem de sequestrar radicais livres. Ao reagir com os compostos fenólicos e ser reduzido, o radical DPPH (Figura 7) de cor púrpura passa a coloração amarela e desta forma é possível medir a descoloração púrpura do radical livre DPPH e estimar o potencial antioxidante de um extrato (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O mecanismo de reação é baseado na transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações com hidrogênio. O método é influenciado pelo solvente e pH das reações (OLIVEIRA et al., 2009). Este método é

considerado simples e rápido para análise de substâncias puras e amostras complexas e é empregado em uma grande parte de trabalhos de avaliação de potencial antioxidante (BENKEBLI, 2005; MENICHINI et al., 2009; SREERAMULU; RAGHUNATH, 2010; TIVERON, MELO, VIEIRA, 2012).



2,2 - Difenil-1-picrilhidrazil

**Figura 7-** Estrutura química do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material vegetal

Foi realizada a análise físico-química de 72 acessos (Tabela 1) *C. annuum* (n= 14), *C. baccatum* (n= 39), *C. chinense* (n= 16), *C. frutescens* (n= 1), e dois acessos de espécies não determinadas do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Desses 72 genótipos, 51 foram submetidos as análises de compostos fenólicos totais, potencial antioxidante e carotenóides totais, e 40 foram avaliados em relação a concentração de capsaicinoides. Os acessos avaliados são variedades crioulas cujas sementes foram doadas por agricultores dos estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná e do Mato Grosso do Sul. Estes acessos apresentam grande variabilidade genética para caracteres de fruto, como formato, cor, tamanho, aroma e pungência.

Em 2012/2013, as plantas provenientes de casa de vegetação ou cultivados em campo experimental, foram cultivadas com espaçamento de 0,6m entre plantas e de 1,2m entre linhas. A adubação e correção da acidez do solo foi realizada de acordo com a recomendação para *Capsicum annuum* (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004). Os frutos foram colhidos entre os meses de fevereiro e maio,

no estágio de maturação completa, entre 9 e 10 horas da manhã. Logo após a remoção das sementes, os frutos foram transportados até o laboratório e avaliados quanto ao pH, acidez, sólidos solúveis e cor; o restante dos frutos foram armazenados a -20°C para as avaliações seguintes. Antes de cada avaliação uma amostra de aproximadamente 10 g de pimenta sem semente foi macerada com o auxílio de N<sub>2</sub> líquido em moinho analítico.

**Tabela 1-** Acessos avaliados e respectivas espécies

<i>Capsicum baccatum</i>	P9
<i>Capsicum baccatum</i>	P14
<i>Capsicum annuum</i>	P22
<i>Capsicum baccatum</i>	P25
<i>Capsicum baccatum</i>	P27
<i>Capsicum baccatum</i>	P28
<i>Capsicum baccatum</i>	P34
<i>Capsicum chinense</i>	P38
<i>Capsicum annuum</i>	P46
<i>Capsicum baccatum</i>	P49
<i>Capsicum baccatum</i>	P50
<i>Capsicum baccatum</i>	P59
<i>Capsicum baccatum</i>	P61
<i>Capsicum chinense</i>	P65
<i>Capsicum baccatum</i>	P71
<i>Capsicum chinense</i>	P72
<i>Capsicum annuum</i>	P76
<i>Capsicum baccatum</i>	P79
<i>Capsicum baccatum</i>	P87
<i>Capsicum baccatum</i>	P89
<i>Capsicum baccatum</i>	P92
<i>Capsicum baccatum</i>	P93
<i>Capsicum annuum</i>	P100
<i>Capsicum baccatum</i>	P103
<i>Capsicum baccatum</i>	P105
<i>Capsicum baccatum</i>	P108
<i>Capsicum baccatum</i>	P110
<i>Capsicum chinense</i>	P116
<i>Capsicum baccatum</i>	P117
<i>Capsicum annuum</i>	P119
<i>Capsicum baccatum</i>	P120
<i>Capsicum annuum</i>	P122
<i>Capsicum annuum</i>	P134
<i>Capsicum chinense</i>	P135
<i>Capsicum annuum</i>	P136

**Tabela 1-** Acessos avaliados e respectivas espécies  
(continuação)

<i>Capsicum annuum</i>	P161
<i>Capsicum baccatum</i>	P169
<i>Capsicum baccatum</i>	P173
<i>Capsicum chinense</i>	P175
<i>Capsicum baccatum</i>	P179
<i>Capsicum chinense</i>	P186
<i>Capsicum annuum</i>	P189
<i>Capsicum chinense</i>	P191
<i>Capsicum baccatum</i>	P197
<i>Capsicum chinense</i>	P200
<i>Capsicum annuum</i>	P161
<i>Capsicum baccatum</i>	P169
<i>Capsicum baccatum</i>	P173
<i>Capsicum chinense</i>	P175
<i>Capsicum baccatum</i>	P179
<i>Capsicum chinense</i>	P186
<i>Capsicum annuum</i>	P189
<i>Capsicum chinense</i>	P191
<i>Capsicum baccatum</i>	P197
<i>Capsicum chinense</i>	P200
<i>Capsicum annuum</i>	P203
<i>Capsicum baccatum</i>	P213
<i>Capsicum baccatum</i>	P219
<i>Capsicum frutescens</i>	P224
<i>Capsicum chinense</i>	P228
<i>Capsicum baccatum</i>	P235
<i>Capsicum chinense</i>	P236
<i>Capsicum baccatum</i>	P239
<i>Capsicum baccatum</i>	P241
<i>Não determinada</i>	P242
<i>Capsicum chinense</i>	P245
<i>Capsicum chinense</i>	P246
<i>Capsicum chinense</i>	P247
<i>Capsicum annuum</i>	P258
<i>Capsicum annuum</i>	P259
<i>Capsicum annuum</i>	P269
<i>Capsicum baccatum</i>	P270
<i>Capsicum chinense</i>	P272
<i>Capsicum baccatum</i>	P274
<i>Capsicum baccatum</i>	P278
<i>Capsicum baccatum</i>	P280
<i>Capsicum baccatum</i>	P283
<i>Capsicum baccatum</i>	P284
<i>Capsicum baccatum</i>	P287

**Tabela 1-** Acessos avaliados e respectivas espécies (continuação)

<i>Capsicum baccatum</i>	P294
<i>Capsicum chinense</i>	P295
<i>Capsicum annuum</i>	P302

### 3.2. Avaliações físico-químicas

#### 3.2.1. Sólidos solúveis totais

Para a medida dos sólidos solúveis totais, foi utilizado refratômetro digital (Atago, PR-32α) (0 a 32%) e os valores foram expressos em °Brix.

#### 3.2.2. Acidez total titulável

Amostras de 2g de pimenta foram adicionada de 40 mL de água destilada, homogeneizadas e tituladas com NaOH 0,1mol/L até pH 8,1. Os resultados de acidez total titulável foram expressos em mg de ácido cítrico por 100 g do fruto em base úmida.

#### 3.2.3. Cor da epiderme

A coloração dos frutos foi determinada utilizando colorímetro (Minolta Chromometer, CR 300) no padrão CIE-L\*a\*b\*. O ângulo Hue (°Hue), foi calculado usando a fórmula  $^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1}b^*/a^*$ . Valores L\* representam luminosidade; a\* definem a escala verde/vermelho e b\* a escala amarelo/azul. As medições de cor foram realizadas em faces opostas na região equatorial de cada fruto.

#### 3.2.4. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método baseado na reação com o reagente Folin-Ciocalteu. Para extração, dois gramas de amostra fresca macerada em moinho de bola (Marconi, MA 350) foi homogeneizada com 20 mL de metanol por uma hora e posteriormente centrifugada por 20 minutos à 5.000rpm em centrifuga (Eppendorf, 5430) refrigerada à 4°C. Para reação, uma alíquota de 250 µL do sobrenadante foi diluída em 4mL de água ultra-pura e o

controle preparado com 250 µL de metanol. Foi adicionado 250 µL de Folin-Ciocalteu 0,25N e homogeneizado no vortex (Phoenix, AP – 56), após 3 minutos de reação foi adicionado 500mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 N e após duas horas de reação à temperatura ambiente feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Jenway, 6700), no comprimento de onda de 725nm (SWAIN; HILLIS, 1959). Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico em 100 gramas do fruto em base úmida.

### 3.2.5. *Teor de carotenoides totais*

O teor de carotenoides totais foi analisado usando o método modificado da AOAC (970.64). Um grama de amostra fresca foi macerada e homogeneizada com 15 mL de solvente extrator (hexano:etanol:acetona:tolueno, na proporção 10:6:7:7), e logo após 1 mL de KOH em metanol 10% (m/v) foi adicionado e homogeneizado em vortex (Phoenix, AP - 56) por um minuto e em seguida submetido a aquecimento em banho-maria (Nova ética, 500/1D) à 56°C por 20 minutos. Após removido do banho, a mistura permaneceu a temperatura ambiente por 1 hora. Alíquotas de 15 mL de hexano foram adicionadas aos frascos e os mesmos foram aferidos à 50mL com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em água 10% (m/v). Os frascos foram homogeneizados e mantidos no escuro por 1 hora. Uma alíquota do sobrenadante foi avaliada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-mini 1240) no comprimento de onda de 454 nm. Os resultados foram expressos em equivalente mg de β-caroteno por 100 grama do fruto em base úmida.

### 3.2.6. *Potencial antioxidante*

O potencial antioxidante foi determinado através do método adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) que mede a capacidade de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). 100 µL do mesmo extrato usado para avaliação de compostos fenólicos foi adicionado à 3,9 mL de solução de DPPH em metanol (100 mM). A solução foi homogeneizada e os frascos mantidos no escuro. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Jenway, 6700) no comprimento de onda de 517nm após 24 horas de reação. Os resultados foram expressos em mmol equivalente Trolox por 100mg do fruto em base úmida.

### 3.2.7. Otimização do método para avaliação de Capsaicinoides

Neste trabalho foram realizadas modificações no método proposto por Wahyuni et al., 2011. Para isto, foi necessária a validação do método, realizada empregando-se algumas figuras de mérito como: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão. Também foram realizados testes para avaliar a influência do solvente utilizado para extração e tempo de sonicação.

### 3.2.8. Otimização da extração de capsaicinoides com o uso de ultrassom

Foi feita a avaliação da eficiência da extração dos capsaicinoides com diferentes solventes (metanol e acetonitrila). Para tal procedimento, foram pesados 300 mg de amostra em frascos de polipropileno com volume de 2 mL, adicionados 1mL de solvente extrator (metanol ou acetonitrila grau HPLC), homogeneizado em vortex (Phoenix, AP - 56) e submetidos a sonicação por 15 minutos, por duas vezes consecutivas, os dois extratos foram combinados e centrifugados por 5 minutos à 13.000 rpm à temperatura ambiente. Após definida a acetonitrila como solvente extrator, em função da maior eficiência na extração de maior quantidade de capsaicinoides, foi feita a otimização do tempo de sonicação. Sendo assim, o procedimento anterior foi aplicado utilizando acetonitrila como solvente extrator e diferentes tempos de sonicação (10, 15, 30 e 45 min.). A quantidade dos capsaicinoides extraídos foram determinados pela área dos picos analisados por CLAE-FL.

#### 3.2.8.1. Método aplicado para avaliação dos capsaicinoides por CLAE-FL

Para análise de capsaicinoides 300 mg de amostra liofilizada de *Capsicum* foram submetidas a extração com 1 mL acetonitrila em banho de ultrassom (Unique, Ultracleaner 1400 A) por 10 minutos por duas vezes consecutivas. Os dois extratos foram combinados e centrifugados por 5 minutos à 13.000 rpm à temperatura ambiente. Dez microlitros do extrato foram injetados, ou quando necessário foi feita a diluição em acetonitrila, em cromatógrafo líquido (Thermo Scientific, Ultimate 300) equipado com pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 x 150 mm, 100

Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA) para separação cromatográfica. Uma solução de ácido acético (0,1% v/v, em água ultrapura, eluente A) e acetonitrila (eluente B) foram usadas como fase móvel. A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL/min utilizando eluição isocrática com 52% de B e temperatura da coluna de 40°C. Os capsaicinoides foram detectados por fluorescência (excitação 280nm, emissão 324 nm) e quantificados em comparação com curva de calibração de capsaicinoides comerciais (capsaicina e dihidrocapsaicina) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os resultados foram expressos em mg por 100g do fruto em base seca.

### 3.2.9. Método aplicado para avaliação de capsaicinoides por UHPLC-MS/MS

Dez microlitros do extrato do genótipo P28 e trinta microlitros do extrato do genótipo P61 foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Nexera) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (maXis Impact). Os capsaicinoides foram separados utilizando uma coluna Kinetex C18 (50 x 2,1 mm x 1,7µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA), com gradiente de 98:2 de B por 1 minuto, seguido 2:98 de B por 7 minutos, finalizando com 98:2 de B por 2 minutos, totalizando 10 minutos. Solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e ácido fórmico em acetonitrila (0,1% v/v, eluente B) foram usadas como fase móvel, com fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo, com voltagem do capilar em 3500 V, pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) de 2 bar, gás de secagem em 10 L/min e temperatura da fonte de 200°C; usando os parâmetros padrão do equipamento. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (de m/z 50 até 1000). As seguintes moléculas protonadas foram monitoradas: nordihidrocapsaicina (m/z 294), capsaicina (m/z 306), dihidrocapsaicina (m/z 308), homocapsaicina (m/z 320), homodihidrocapsaicina (m/z 322), nordihidrocapsaicina (m/z 294) e isômeros da nonivamida (m/z 294).

### 3.3. Análise estatística de dados

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à

análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das espécies pelo teste de LSD ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística foi feita utilizando o software SAS versão 9.2 (Cary, NC).

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.1. Avaliação físico-química

O teor de sólidos solúveis totais (Figura 8) dos genótipos estudados variou de 5,8 (acesso P228 - *C. chinense*) a 15,0 °Brix (acesso P9 - *C. baccatum*), com média geral de  $9,1 \pm 1,8$  (desvio padrão). Estes valores estão dentro da faixa encontrada por Moura et al. (2010) (5,1 a 15,4 °Brix) que avaliaram 56 acessos de *Capsicum chinense* do banco de germoplasma do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Em estudo realizado por Lannes et al. (2007) com 49 acessos de pimenta da espécie *C. chinense* os valores variaram de 6 a 10 °Brix. Segatto (2007) ao realizar a caracterização bioquímica de quatro genótipos de pimentas ornamentais observou que o teor de sólidos solúveis entre os frutos variou de 8,4 à 12,5°Brix. O alto teor de sólidos solúveis é uma característica de interesse para indústria, visto que eleva o rendimento industrial do fruto (PEREIRA et al., 2008).

**Tabela 2-** Características físico-químicas de 72 acessos de pimentas agrupados por espécie

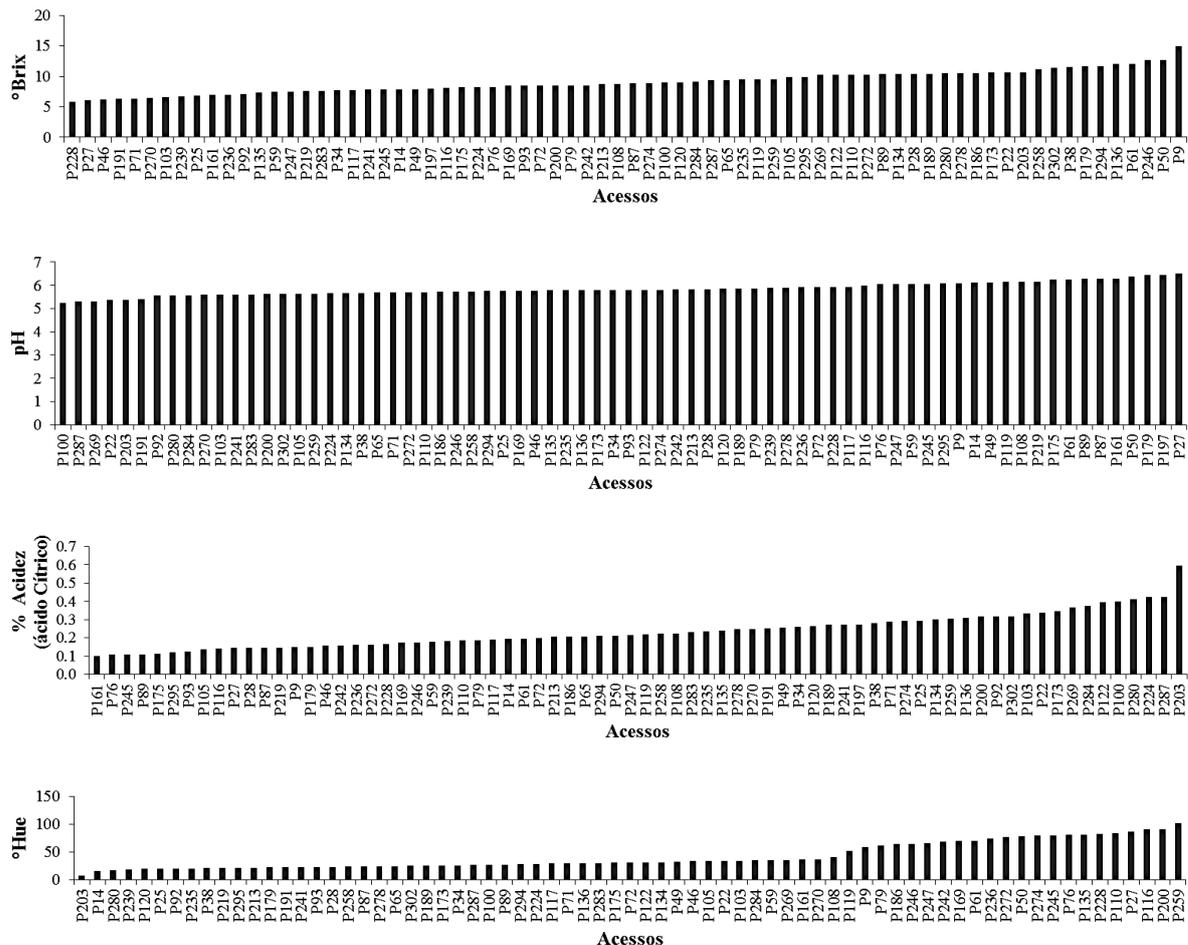
Espécie	pH	°Brix	Acidez	°Hue
<i>C. annuum</i> (15)	5,7 a	9,8 a	0,29 ab	38,0 a
<i>C. baccatum</i> (39)	5,9 a	9,0 a	0,23 b	35,8 a
<i>C. chinense</i> (16)	5,8 a	8,7 a	0,19 b	57,2 a
<i>C. frutescens</i> (1)	5,7 a	8,3 a	0,42 a	27,6 a
ND (1)	5,8 a	8,5 a	0,16 b	67,5 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste LSD ( $p \leq 0,05$ ). Resultados de acidez expressos em g de ácido cítrico  $100\text{g}^{-1}$  do fruto em base úmida; ND - Não determinada.

A determinação da acidez é outro importante parâmetro físico-químico para o processamento de pimentas, visto que em alimentos de baixa acidez, ou seja, com pH superior a 4,5, é indicado o uso de esterilização durante o processamento com o objetivo de eliminar os esporos de *Clostridium botulinum* (FURTADO; DUTRA, 2012). A acidez total titulável (Figura 8) variou de 0,1 g (P161) a 0,6 g de ácido

cítrico/100g de amostra (P203), sendo que os extremos compreendem valores de acidez para acessos da mesma espécie (*C. annuum*), evidenciando a variabilidade existente nos acessos. Entre as espécies, os frutos da *C. frutescens* apresentaram maior acidez que os frutos de *C. chinense* e *C. baccatum*, assim como observado por Oliveira (2011). O pH (Figura 8) variou de 5,2 (P100 - *C. annuum*) a 6,5 (P27 - *C. baccatum*) entre os acessos de pimentas, com média geral de  $5,8 \pm 0,3$ , semelhante ao observado por Valverde (2011) para frutos de *C. chinense* com valor médio de 5,5. Sabe-se que o pH tem uma relação inversamente proporcional a acidez titulável total, ou seja, maior concentração de ácidos no meio faz com que ocorra um aumento de íons  $H^+$  e redução do potencial hidrogeniônico. Entretanto, essa afirmativa somente é válida no caso em que os ácidos encontram-se na forma dissociada. Na célula, esses ácidos geralmente encontram-se associados com seus sais de potássio e constituem sistemas tampões. A capacidade tampão de alguns sucos permite que ocorram grandes variações na acidez titulável, sem variações apreciáveis no pH (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Além do teor de sólidos solúveis, acidez e pH, a cor é outro importante parâmetro de qualidade do fruto, principalmente para indústria. O ângulo Hue, determinado pelas coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , define a tonalidade dos frutos. Amarelo, laranja e vermelho são as cores características dos frutos maduros. Dentre os genótipos avaliados o ângulo Hue (Figura 8) variou de 6,73 a 102,19°, indicando que os frutos apresentam tonalidade em uma faixa do vermelho púrpura ao amarelo claro. A média do ângulo Hue (Tabela 2) observada para acessos de *C. annuum* (42,6°) está de acordo com Wall e Bosland (1998), que verificaram que amostras de páprica (condimento obtido a partir do processamento de frutos de *C. annuum*) geralmente apresentam ângulo Hue entre 30 e 45°, faixa que expressa cor que vai do vermelho ao laranja.



**Figura 8-** pH, teor de sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (AT) e tonalidade (°Hue) de 72 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.). Resultados de acidez expressos em g de ácido cítrico 100g<sup>-1</sup> do fruto em base úmida.

Em *Capsicum* spp. os carotenóides são os principais compostos responsáveis pela da coloração dos frutos (DUARTE et al., 2004). O teor de carotenóides (Figura 10) dos acessos variou de 1,54 (P116 - *C. chinense*) a 54,11 mg de  $\beta$ -caroteno por 100g de fruto (P179 - *C. baccatum*), com média geral de  $32,16 \pm 15,77$  mg  $\beta$ -caroteno em 100g de fruto fresco. Entre as espécies (Tabela 3), os frutos de *C. baccatum* apresentaram concentração média de carotenóides superior ao observado para as outras espécies estudadas. Oliveira (2011), também observou maior concentração de carotenóides nos frutos de *C. baccatum* comparado aos frutos de *C. chinense*. Em estudo para avaliação da variabilidade genética de oito variedades de *C. annum* DeMasi et al. (1997) observaram que teor de carotenóides totais dos frutos variaram entre 1,2 a 2,6 mg 100g<sup>-1</sup>. Já Rodriguez-Urbe et al. (2012), ao analisarem o pericarpo do fruto maduro de seis cultivares de coloração laranja da mesma espécie, observaram uma faixa de concentração de carotenóides mais

ampla (1 a 16 mg 100g<sup>-1</sup>), evidenciando a variabilidade da concentração destes compostos dentro de uma mesma espécie. Ainda que geneticamente iguais, outros fatores extrínsecos também influenciam o teor desses compostos nos frutos. Wahyuni et al. (2011) ao avaliar a composição química de 32 acessos de *Capsicum* spp. das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* observaram uma concentração total de carotenóides próximo ao observado neste estudo.

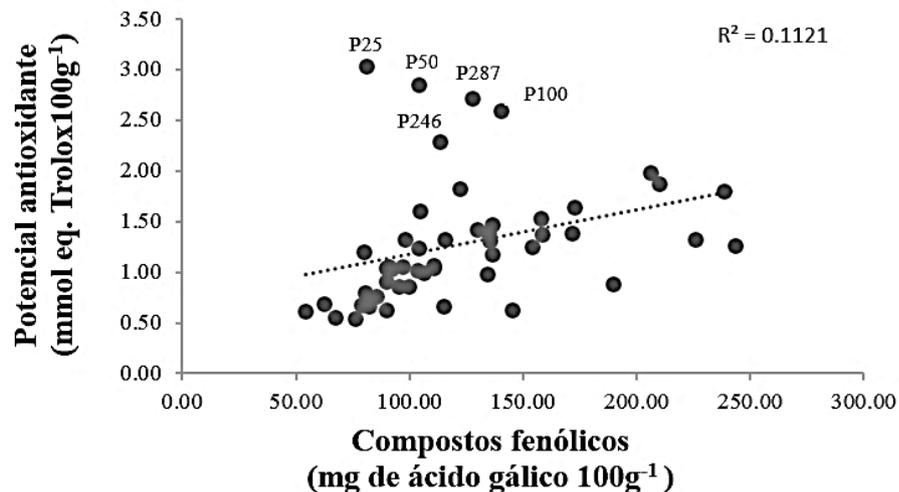
Em relação ao teor de compostos fenólicos dos frutos (Figura 10), houve uma variação de 54,4 (P179) a 243,47 mg de ácido gálico em 100g do fruto (P89), sendo os dois extremos (mínimo e máximo) representados por acessos da espécie *C. baccatum*, e a média geral de compostos fenólicos dos frutos 122,08 mg de ácido gálico em 100g. Estes resultados estão de acordo com Bae et al. (2012), que relatou valores entre 91 a 138 mg de compostos fenólicos totais expressos em catequina por 100 g de fruto de diferentes cultivares de pimentas. Já Oliveira (2011), ao avaliar frutos de três diferentes espécies de pimentas (*C. baccatum*; *C. chinense* e *C. frutescens*), observou uma faixa de 25,96 a 65,61 mg de compostos fenólicos em 100g de fruto. Entre espécies (Tabela 3), observou-se maior concentração de compostos fenólicos nos frutos de acesso *Capsicum* spp. cuja espécie não foi determinada (200,53), seguido dos frutos da espécie *C. annuum* (175,52), *C. chinense* (144,39) e *C. baccatum* (100,67). Vasconcelos (2012), ao avaliar 18 acessos de *C. baccatum* em frutos no estágio de maturação completa, observou que o teor de compostos fenólicos variou de 95,42 a 252,55 mg 100g<sup>-1</sup>. Já para frutos da espécie *C. annuum* Perucka e Mazgorzata (2007) observaram valores inferiores ao observado neste estudo (37,54 a 67,35 mg 100g<sup>-1</sup>).

**Tabela 3-** Compostos fitoquímicos de 51 acessos de pimentas agrupados por espécie

<b>Espécie</b>	<b>FT</b>	<b>AA</b>	<b>CT</b>
<i>C. annuum</i> (10)	182,32a	1,56 a	30,69 a
<i>C. baccatum</i> (35)	110,67b	1,15 a	34,94 a
<i>C. chinense</i> (5)	144,39ab	1,53 a	23,21 ab
ND (1)	157,59a	1,52 a	1,85 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo LSD ( $p \leq 0,05$ ). Resultados de FT expressos em mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup> de amostra em base úmida; Resultados de AA expressos em mmol eq. Trolox 100g<sup>-1</sup> de amostra em base úmida; Resultados de CT expressos em mg  $\beta$ -Caroteno 100g<sup>-1</sup> do fruto em base úmida. ND - Não determinada.

A faixa de potencial antioxidante dos frutos variou de 0,5 a 3,0 mmol eq. Trolox 100g<sup>-1</sup>, com média geral de 1,3 ± 0,7. Sendo que os acessos da espécie *C. annuum*, foram os que apresentaram maior potencial, seguidos da *C. chinense*. Existem alguns estudos que indicam correlação entre o potencial antioxidante avaliado por DPPH e o teor de compostos fenólicos (BAE et al., 2012), enquanto que outros estudos não observam essa relação (CONFORTI; STATTI; MENICHINI, 2011). Neste trabalho foi observado baixa ( $R^2=0,1121$ ) correlação entre o potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos (Figura 9) dos frutos de *Capsicum* avaliados, entretanto se removido os acessos P25, P50, P287, P100 e P246, tais que aparecem como *outliers* (pontos fora da curva), o coeficiente de correlação aumenta para 0,4481, indicando maior correlação entre os dois parâmetros.



**Figura 9-** Correlação entre o potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos.

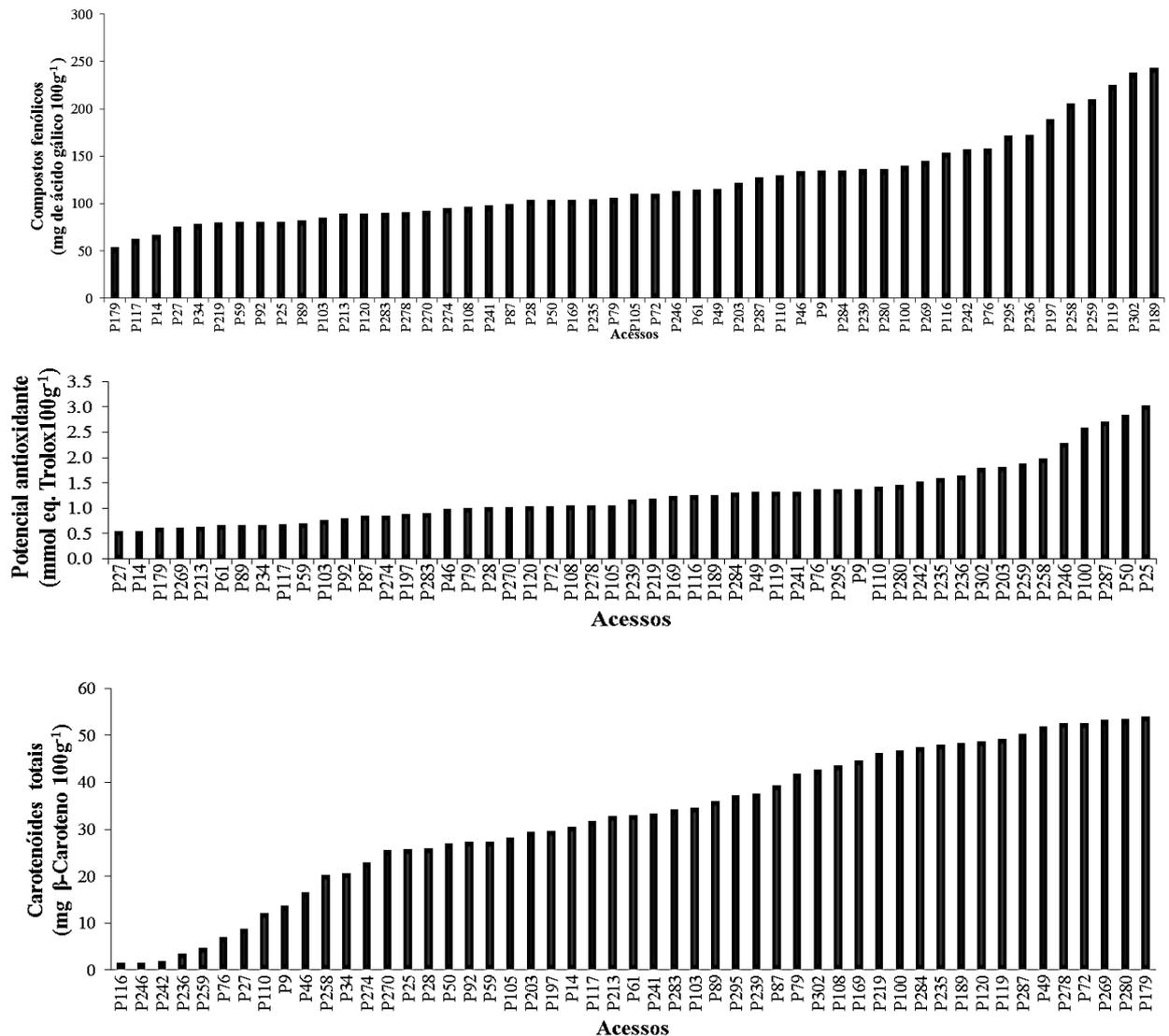
A população, de modo geral, tem se tornado mais exigente, além da preocupação com a qualidade da alimentação no que diz respeito à questão nutricional, também questionam as propriedades funcionais dos alimentos. Além do interesse dos agricultores na obtenção de cultivares mais produtivas e tolerantes a estresses bióticos e abióticos, o melhoramento genético também deve ter como finalidade a obtenção de cultivares que apresentem elevado teor de compostos funcionais com importância para a saúde dos consumidores (NEITZKE, 2012). O desenvolvimento de cultivares ricas em compostos funcionais tem se tornado um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de hortaliças (CARVALHO et al., 2006).

Neste estudo, observou-se que o potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos encontrado para os genótipos de *Capsicum* estudados é superior ao relatado para vegetais muito consumidos em vários países, como arroz, feijão, beterraba, cenoura, batata, cebola, abóbora, dentre outros (SREERAMULU; RAGHUNATH, 2010).

A moléculas que apresentam potencial antioxidante, como exemplo os compostos fenólicos, carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e capsaicinoides, são capazes de inibir processos oxidativos biológicos no organismo humano (RAHMAM; BISWAS; KODE, 2006). Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos e ligninas merecem destaque em relação ao potencial antioxidante. Além dos flavonóides, ácidos fenólicos com elevado potencial antioxidante como o ácido protocatecuico, clorogênico e cumárico também foram relatados em algumas variedades de *Capsicum* (SHWEIGGERT et al., 2006). Os ácidos fenólicos apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos metoxila ou hidroxila na molécula (responsáveis potencial antioxidante).

Os carotenoides também são importantes antioxidantes presentes em pimentas. Dentre os carotenoides, a capsantina e a capsorrubina são formas oxigenadas destes compostos mais comumente encontrada nos frutos de pimenta maduros (WAHYUNI et al., 2011; MÍNGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MÉNDEZ, 1993) e apresentam significativo potencial antioxidante (DUTTA et al., 2004). De acordo com Mínguez-Mosquera e Hornero-Méndez (1993) o aparecimento de alguns tipos de câncer está relacionado à falta de xantofilas na dieta. A zeaxantina, carotenóide oxigenado presente em pimentas, atua na prevenção da degeneração macular relacionada a idade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e a luteína e a  $\beta$ -criptoxantina apresentam atividade antitumoral (COLLERA-ZÚÑIGA et al., 2005).

A concentração de carotenoides encontradas para os frutos avaliados neste estudo foi superior ao observado por Reif et al. (2013) para vegetais como tomate e cenoura, conhecidos e recomendados mundialmente como fonte de carotenoides.



**Figura 10-** Teor de compostos fenólicos totais, potencial antioxidante e carotenóides totais de 51 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.). Resultados de FT expressos em mg de ácido gálico 100g<sup>-1</sup> do fruto em base úmida; Resultados de AA expressos em mmol eq. Trolox 100g<sup>-1</sup> do fruto em base úmida; Resultados de CT expressos em mg β-Caroteno 100g<sup>-1</sup> do fruto em base úmida.

De acordo com Oliveira et al, 2000 a estimativa de consumo diário de pimenta moída por pessoa, é de 0,050g a 5 g na Europa, de 2,5 g na Índia, de 5 g na Tailândia e de 8 g na Coreia do Sul. Considerando os dados obtidos neste estudo, a cada 1 grama de pimenta consumido, estima-se o consumo de aproximadamente 1,22 mg e 0,32 mg de compostos fenólicos e carotenoides, respectivamente.

Apesar de não existir uma ingestão diária recomendada (IDR) específica para compostos fenólicos e carotenoides, sabe-se, que a ingestão desses compostos é importante na alimentação humana devido aos vários benefícios a saúde, que vão

além ao potencial antioxidantes. Os carotenóides, por exemplo, também são precursores da vitamina A, que não é produzida naturalmente pelo organismo humano e é essencial para o crescimento, desenvolvimento, manutenção de tecidos epiteliais, reprodução, sistema imunológico e para o funcionamento do ciclo visual na regeneração de fotorreceptores (DUTTA et al., 2004).

Em outro contexto, para as plantas a presença destes metabólitos funciona como um mecanismo de proteção a estresses (SCHULZE; SPITELLER, 2009). Park et al. (2012), por exemplo, observaram a indução de produção de polifenóis em *C. annuum* infectados com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose, principal patógeno da pimenta *Capsicum*. Orober et al. (1999) também observaram que geralmente ocorre maior atividade de polifenoloxidase nos tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas sadias. Sendo assim, é possível que o aumento dos compostos fenólicos também esteja relacionado ao aumento da atividade da polifenoloxidase, visto que a polifenoloxidase apresenta a capacidade de oxidar compostos fenólicos à quinonas, os quais são mais tóxicos aos microrganismos do que os compostos fenólicos originais (CAMPOS et al., 2004).

É válido ressaltar que neste estudo foi avaliado apenas o pericarpo e a placenta dos frutos de pimenta, visto que os frutos são geralmente consumidos sem as sementes e, em alguns casos, as sementes dos genótipos foram removidas para armazenamento no banco de germoplasma, o que possivelmente ocasionou a quantificação de uma menor concentração de compostos. Os frutos avaliados foram cultivados à campo ou em casa de vegetação, entretanto este parâmetro não foi considerado neste trabalho.

## **4.2. Otimização e validação do método para avaliação de capsaicinoides**

### **4.2.1. Curvas de calibração e figuras de mérito**

A Tabela 4 apresenta os parâmetros das curvas analítica de capsaicina e dihidrocapsaicina obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (FL), com seus respectivos intervalos de concentração, avaliados em diferentes dias. Todas as curvas apresentaram altos coeficientes de correlação (R),  $R \geq 0,998$ , indicando uma boa linearidade das curvas para ambos

analitos investigados, e a sensibilidade (a, inclinação da curva) foi semelhante entre os dois dias avaliados.

Em ambos os dias avaliados foi verificado que o método apresentou limite de detecção (LD) inferior a  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  para capsaicina e  $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$  para dihidrocapsaicina, indicando que o método otimizado apresentou uma boa capacidade de detecção comparado a outros estudos (KARNKA et al. 2002; JUANGSAMOOT et al., 2012). Em relação aos limites de quantificação foi possível observar uma pequena variação entre os dias observados, entretanto observa-se que o método apresenta capacidade de quantificar até aproximadamente  $8 \text{ ng mL}^{-1}$  de capsaicina e  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  de dihidrocapsaicina. Além disso, o método apresentou baixa variação entre os dias avaliados, com desvio padrão relativo de 0,28% para capsaicina e 0,59% para dihidrocapsaicina.

**Tabela 4-** Parâmetros das curvas analítica de capsaicina e dihidrocapsaicina analisadas por CLAE com detector de fluorescência

Analito	IC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Parâmetros				Entre dias	
		A ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LD ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	LQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	RSD (%)	RSD (%)
Capsaicina	1-10	37031	2,38	7,95	0,998	0,19	0,28
Dihidrocapsaicina	1-10	94329	0,54	3,12	0,999	0,19	0,59

IC: intervalo de concentração; a: inclinação, LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação, R<sup>2</sup>: coeficiente de correlação ao quadrado, RSD: desvio padrão relativo.

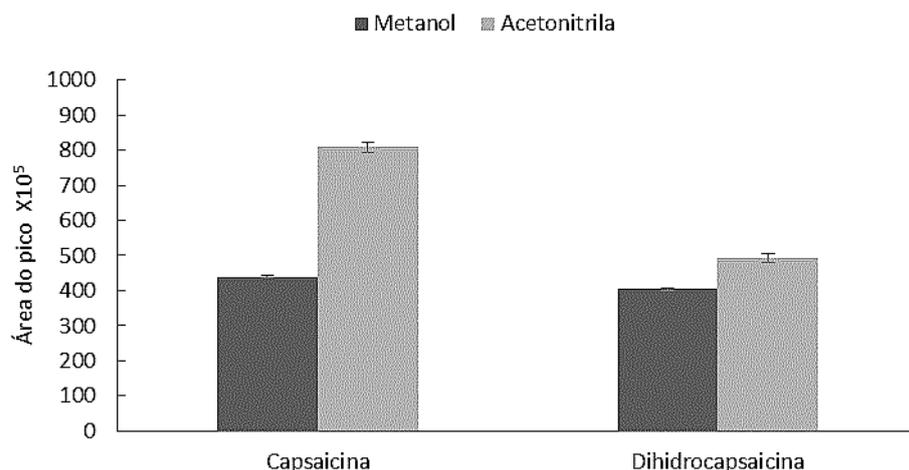
#### 4.2.2. Otimização do solvente extrator e tempo de sonicação

Na literatura são mencionados diferentes solventes para extração de capsaicinóides, sendo o metanol (WAHYUNI et al., 2011; ANTONIOUS et al., 2009; CHINN et al., 2011) e a acetonitrila (COLLINS et al., 1995; SINGH et al., 1999; PINO et al., 2007) os solventes mais frequentemente aplicados. Karnka et al. (2002) ao avaliar três diferentes solventes (metanol, acetona e acetonitrila) para extração de capsaicinóides, observou que a acetonitrila apresentou maior eficiência e permitiu a obtenção de extratos com maior pureza em relação aos outros solventes. Neste estudo, ao avaliarmos a eficiência de metanol e acetonitrila como extratores, observou-se que a acetonitrila apresentou eficiência superior ao metanol para extração de capsaicina e dihidrocapsaicina (Figura 11).

Dessa forma, acetonitrila foi adotado como solvente extrator no restante do trabalho.

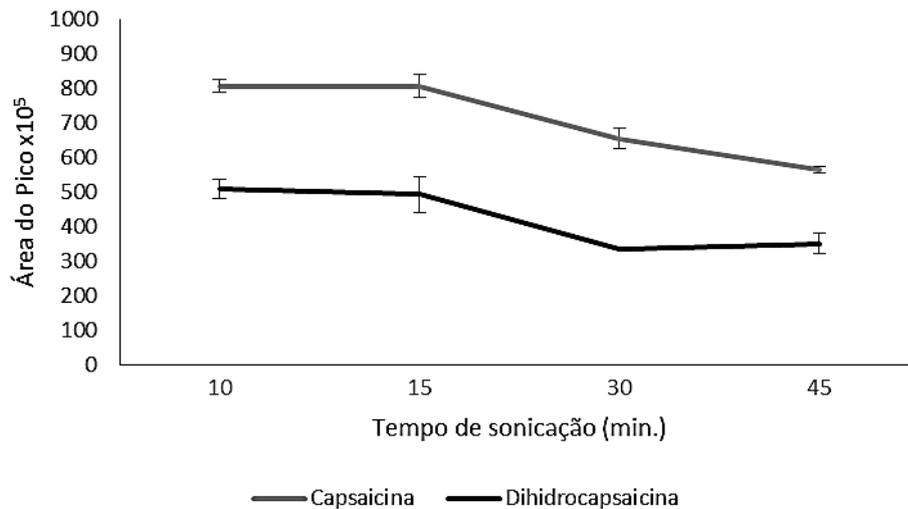
Em conjunto aos solventes, geralmente são aplicadas a técnicas como ultrassom (WAHYUNI et al., 2011), aquecimento (CHINN et al., 2011) ou soxhlet (PEÑA-ALVAREZ et al., 2012), com o objetivo de facilitar e/ou melhorar a extração. Entretanto técnicas de aquecimento e/ou soxhlet apresentam desvantagens em relação ao ultrassom, visto que para aplicação da técnica de soxhlet, por exemplo, é necessário o uso de maior quantidade de amostra, solvente e tempo de extração, bem como, a aplicação de temperaturas superiores (PEÑA-ALVAREZ et al., 2012), o que pode promover a degradação dos compostos.

O ultrassom é uma técnica muito utilizada para o preparo de amostra aplicada a diferentes matrizes. Os fundamentos para aplicação do ultrassom, nesses processos, está relacionado ao fenômeno da cavitação ocasionado por ondas de choque, resultantes da aplicação do campo acústico sobre um meio material. Essas ondas acentuam a interação entre a fase líquida e a superfície dos sólidos, aumentando a concentração das espécies presentes na fase líquida, sem degradar os compostos (SORIANO, 2006).



**Figura 11-** Comparação do potencial de extração dos capsicinoides entre metanol e acetonitrila. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n=3).

Para otimização do procedimento de extração foi avaliado o tempo de 10, 15, 30 e 45 minutos de sonicação (Figura 12). Observou-se que em 30 e 45 minutos houve uma redução da quantidade de capsaicinóides extraída, enquanto que em 10 e 15 minutos não houve diferença, logo optou-se pelo uso de 10 minutos de sonicação do extrato.



**Figura 12-** Média da área dos picos de capsaicina e dihidrocapsaicina em função do tempo de sonicação do extrato. Barras verticais indicam o erro padrão da média (n=3).

Após estipulado tais parâmetros, foi feita a adição e recuperação de analito com o objetivo de averiguar a exatidão do método. Neste estudo, se obteve um índice de recuperação de 76% para capsaicina e 80% para dihidrocapsaicina, com desvio padrão relativo de 3 e 3%, respectivamente. Um intervalo de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ , é considerado aceitável (RIBANI et al., 2004).

### 4.3. Avaliação dos capsaicinoides

#### 4.3.1. Avaliação de capsaicinoides por CLAE-FL

A concentração de capsaicina (Figura 13) dos genótipos avaliados pela técnica de CLAE-FL apresentou uma ampla variação, observou-se valores de 1,00 (acesso P105 - *C. baccatum*) a 19358,70 mg em 100g<sup>-1</sup> de fruto em base seca (acesso P236 - *C. chinense*), e média geral de 1913,96. Esses valores evidenciam a grande variabilidade dos genótipos estudados. A concentração média de capsaicina encontrada para os frutos estudados neste trabalho encontra-se na mesma ordem

de grandeza que o observado por Thapa et al. (2009) para 16 frutos de *Capsicum* do Nepal que chegaram a 1973 mg 100g<sup>-1</sup> em base seca. Essa ampla variabilidade no teor de capsaicinoides também foi relatada por Antonious, Berke e Jarret (2009) ao estudarem 63 acessos de *C. chinense*, cujos valores máximo e mínimo de capsaicina dos frutos variaram em cem vezes.

Entre as espécies (Tabela 5), observou-se maior concentração de capsaicina nos frutos de *C. chinense* (9778,73), seguido dos frutos de *C. baccatum* (892,29). Antonious e Jarret (2006) também relataram maior concentração de capsaicina nos frutos de *C. chinense*, quando comparado aos frutos de *C. frutescens* e *C. baccatum*. Ainda que em concentração muito inferior as outras espécies avaliadas, também foi detectado capsaicina nos frutos de *C. annuum* (0,93).

Em relação a concentração de dihidrocapsaicina (Figura 13), houve uma variação de 0,03 (P116) a 186,00 mg em 100g<sup>-1</sup> do fruto em base seca (P236), sendo os dois extremos (mínimo e máximo) representados por acessos da espécie *C. chinense*, e a média geral de dihidrocapsaicina de 28,18. Assim como o ocorrido para capsaicina, os frutos da espécie *C. chinense* apresentaram maior concentração de dihidrocapsaicina (126,25) que o os frutos da espécie *C. baccatum* (15,99) e também foi detectado dihidrocapsaicina nos genótipos de *C. annuum* (0,04) avaliados.

**Tabela 5-** Conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina de 40 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.)

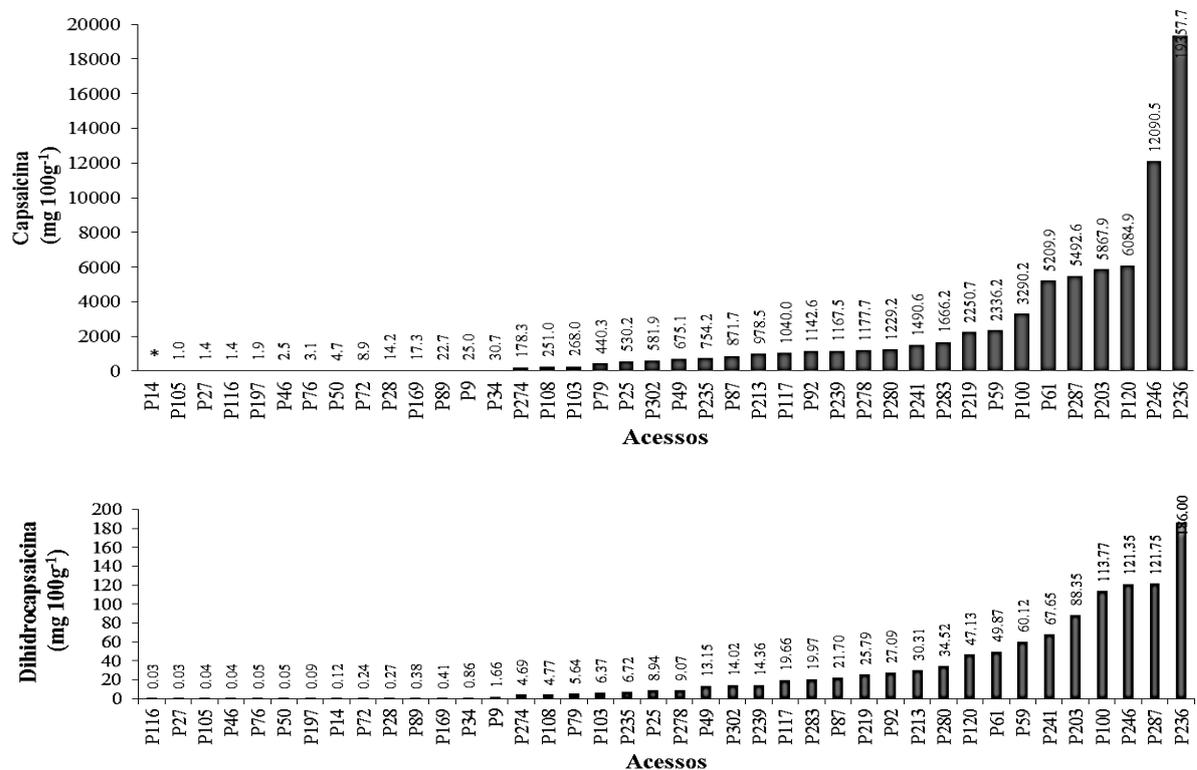
<b>Espécie</b>	<b>Capsaicina</b>	<b>Dihidrocapsaicina</b>
<i>C. annuum</i>	2290,93B	50,55 A
<i>C. baccatum</i>	1140,45 B	19,46 A
<i>C. chinense</i>	6408,09 A	64,33 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo LSD ( $p \leq 0,05$ ). Resultados expressos em mg 100g<sup>-1</sup> de amostra em base seca.

Garcés-Claver et al. (2006) ao avaliarem onze genótipos de *Capsicum* observaram uma faixa de 0,8 a 663,9 e 0,2 a 372,7 mg em 100g de fruto em base seca de capsaicina e dihidrocapsaicina, respectivamente, inclusive em acessos de *C. annuum*. Outros estudos também relatam a presença de capsaicinoides em frutos da espécie *C. annuum* (ESTRADA et al., 2002; DÍAZ et al., 2004). Logo, dentro

dessa espécie encontra-se genótipos com e sem pungência. Esse fenômeno pode estar relacionado a possíveis modificações no DNA durante a evolução do gênero *Capsicum*, ocasionadas, por exemplo, pela ação de retrotransposons, pedaços de DNA capazes de se movimentar pelo genoma alterando a estrutura e a expressão gênica (TAM et al., 2009).

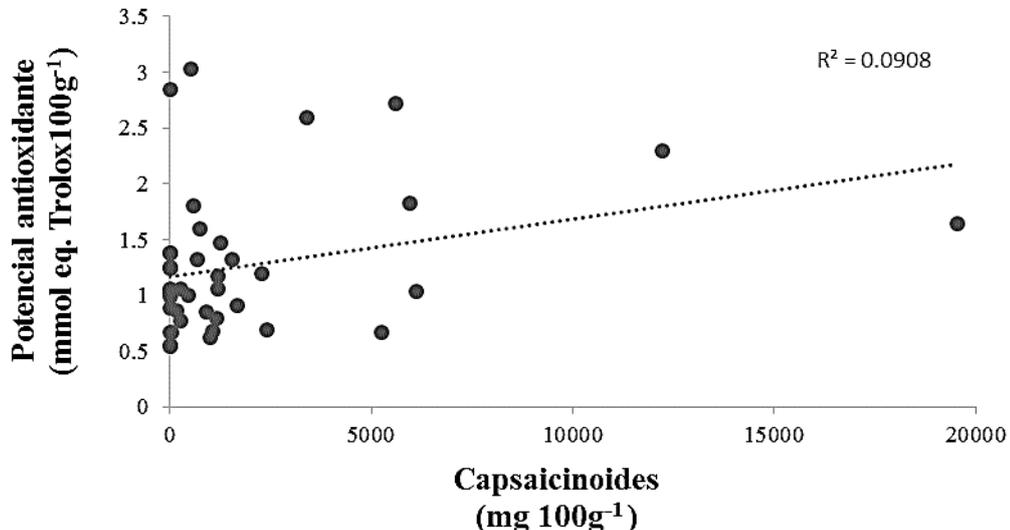
A variabilidade no teor de capsaicinoides, assim como dos outros compostos avaliados nos genótipos estudados é uma característica desejável, visto que demonstra a ampla variabilidade genética das variedades crioulas disponível para o melhoramento genético. O uso dessa variabilidade é que permite, por meio de combinações genéticas, o surgimento de novas cultivares mais adaptadas, produtivas, resistentes a doenças (RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008) e/ou ainda com características desejáveis ao consumidor, como uma maior concentração de compostos bioativos combinados com maior ou menor grau pungência, de acordo com a necessidade.



**Figura 13-** Teor de capsaicina e dihidrocapsaicina de 40 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.). Resultados expressos em mg 100g<sup>-1</sup> do fruto em base seca. \*Não detectado.

Os acessos P14, P105 e P27 apresentaram menor concentração de capsaicinóides, até dezesseis mil vezes menor que a concentração média de capsaicinóides observado para os genótipos avaliados, podendo ser indicados para programas de melhoramento genético de pimentas de baixa pungência, recomendadas para o consumo *in natura*. Já os acessos P236, P246 e P120 destacaram-se dos demais genótipos por apresentarem elevado teor de capsaicinóides, características desejáveis para elaboração de condimentos, conservas e outros processados.

Embora vários estudos atribuam potencial antioxidante aos capsaicinóides (ROSA et al., 2002; MAZIDA et al., 2005; WAHYUNI et al., 2011), neste trabalho foi observado uma baixa ( $R^2=0,0908$ ) correlação entre o teor total de capsaicinóides e o potencial antioxidante dos frutos de *Capsicum* avaliados por DPPH (Figura 14). Acredita-se que este resultado possa estar relacionado a elevada variabilidade do teor de capsaicinóides entre os acessos.



**Figura 14-** Correlação entre o potencial antioxidante e o teor de capsaicinóides totais.

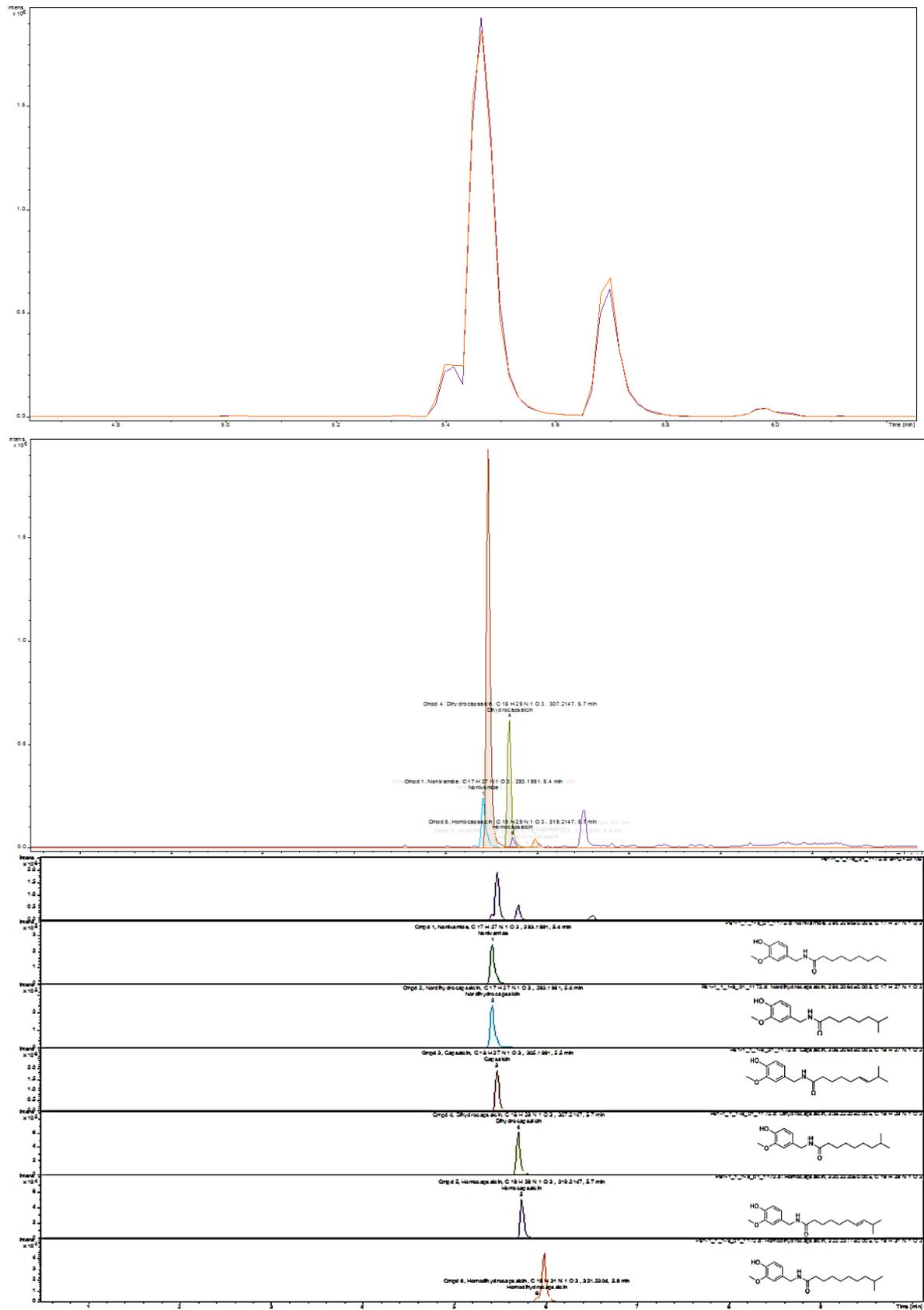
#### 4.3.2. Avaliação de capsaicinóides por UHPLC-MS/MS

Duas das amostras analisadas por CLAE-FL foram também avaliadas por UHPLC-MS/MS. Com base no cromatograma de íons (Figura 15) totais de cada amostra, os íons referentes ao íon molecular protonado dos seguintes

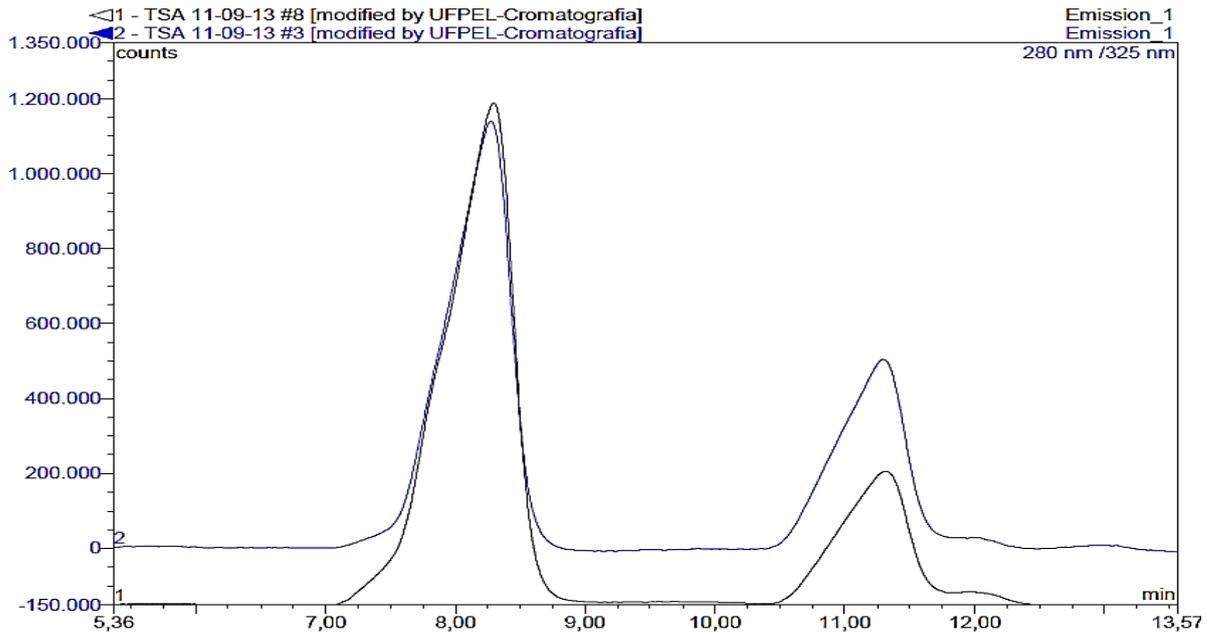
capsaicinóides, nonivamida, nordihidrocapsaicina, capsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina, foram monitorados.

Os espectros de massas dos sinais com tempo de retenção 5,4 min. apresentaram um pico com  $m/z$  295 ( $M^+$ ,  $C_{17}H_{27}N_1O_3$ ) correspondente ao íon molecular e pico base com  $m/z$  294, indicando a presença dos isômeros nonivamida e nordihidrocapsaicina nos extratos de *Capsicum*, com erro de 1,8 e 1,9 ppm, respectivamente, comparado ao espectro teórico dos mesmos (Figura 17). Já o espectro de massas referente ao sinal com tempo de retenção 5,5 min. apresentou íon molecular em  $m/z$  307 ( $M^+$ ,  $C_{18}H_{27}N_1O_3$ ) e pico base com  $m/z$  306, indicando a presença da capsaicina nos extratos, com erro de -1,4ppm comparado ao espectro teórico deste composto (Figura 17). Os espectros de massas dos sinais com tempo de retenção de 5,7 apresentaram o pico do íon molecular em  $m/z$  309 e 321 e pico base com  $m/z$  308 e 320, indicando a presença da dihidrocapsaicina e homocapsaicina, com erro de 0,6 e -3,5 ppm comparado aos respectivos espectros teórico (Figura 18). O espectro do sinal com tempo de retenção 6,0 min. apresentou pico base com  $m/z$  322 ( $C_{19}H_{31}N_1O_3$ ) referente homodihidrocapsaicina, com erro 0,9 ppm comparando ao espectro teórico do composto (Figura 18).

Nos espectros de ambas as amostras analisadas (Figura 15) por UHPLC-MS/MS podemos observar os compostos nonivamida e nordihidrocapsaicina apresentam os mesmo tempo de retenção ( $t_R=5,4$  min.), seguido da capsaicina ( $t_R=5,5$ ), da dihidrocapsaicina e da homocapsaicina (ambas com  $t_R=5,7$ ) e homodihidrocapsaicina ( $t_R= 6,0$ ), enquanto que pela técnica de CLAE-FL (Figura 16), observa-se somente dois picos, detectados no mesmo tempo de retenção que os padrões de capsaicina ( $t_R=8,3$ ) e dihidrocapsaicina ( $t_R=11,3$ ). Fato que indica a ocorrência de uma possível co-eluição dos compostos avaliados.



**Figura 15-** Cromatograma de íons totais e cromatograma de íons extraídos do genótipo P61.



**Figura 16-** Cromatograma dos padrões capsaicina e dihidrocapsaicina (traço azul) e genótipo P61 (traço preta) analisados por detector de fluorescência.

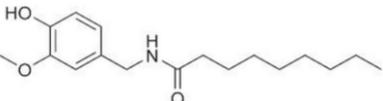
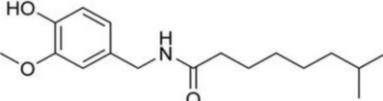
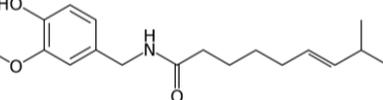
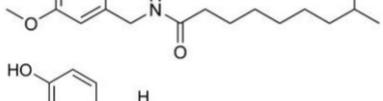
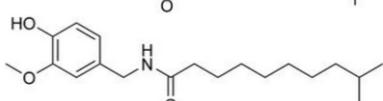
Segundo Topuz e Ozdemir (2007) mais de 20 capsaicinoides já foram identificados em pimentas *Capsicum*, dentre os quais a capsaicina e a dihidrocapsaicina são as mais pungentes e perfazem aproximadamente 90% do total de capsaicinoides. Neste estudo, menor percentual de capsaicina e dihidrocapsaicina em relação aos outros capsaicinoides foi observado nos extratos, 77,9 % no genótipo P28 e 79,2% no genótipo P61, sendo o restante composto por capsaicinoides minoritários (Tabela 5). Logo, estima-se que aproximadamente 80% dos compostos quantificados pela técnica de CLAE-FL corresponda a capsaicina e dihidrocapsaicina.

Kozukue et al. (2005) ao utilizar a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), identificou a presença de oito capsaicinoides em extratos de pimentas, dentre eles capsaicina, nonivamida, nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina (I e II) e homodihidrocapsaicina (I e II). Choi et al. (2006) ao fazer o uso da técnica de espectrometria de massas, também relataram a presença dos mesmos capsaicinoides em frutos e produtos de pimentas da Coreia.

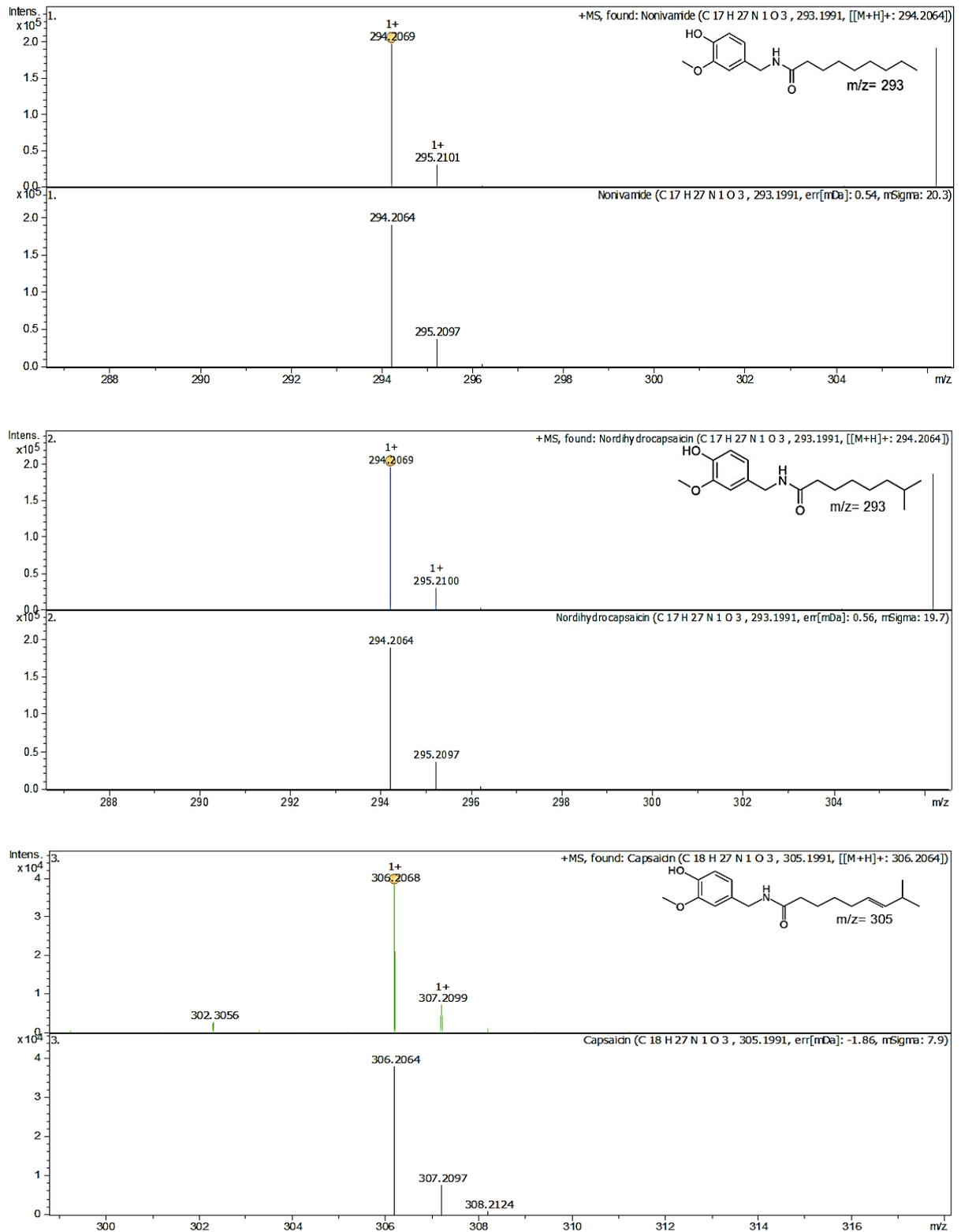
Barbero et al., (2008) ao desenvolverem método de análise por UHPLC-RF empregando coluna monolítica de fase reversa, também relataram a identificação dos compostos capsaicina, nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina em frutos de *C. frutescens*.

De forma geral, mais de 20 capsaicinoides já foram identificados em pimentas *Capsicum* (TOPUZ; OZDEMIR, 2007). Dentre eles a capsaicina, nonivamida, nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina, homocapsaicina (I e II) e homodihidrocapsaicina (I e II) apresentam pungência (DÍAZ et al., 2004), mas também há capsaicinoides não-pungentes, tais como o  $\omega$ -hidroxicapsaicina (OCHI et al., 2003). Além disso, também há um grupo semelhante aos capsaicinoides mas que não apresentam pungência, esses denominados capsinóides (DÍAZ et al., 2004).

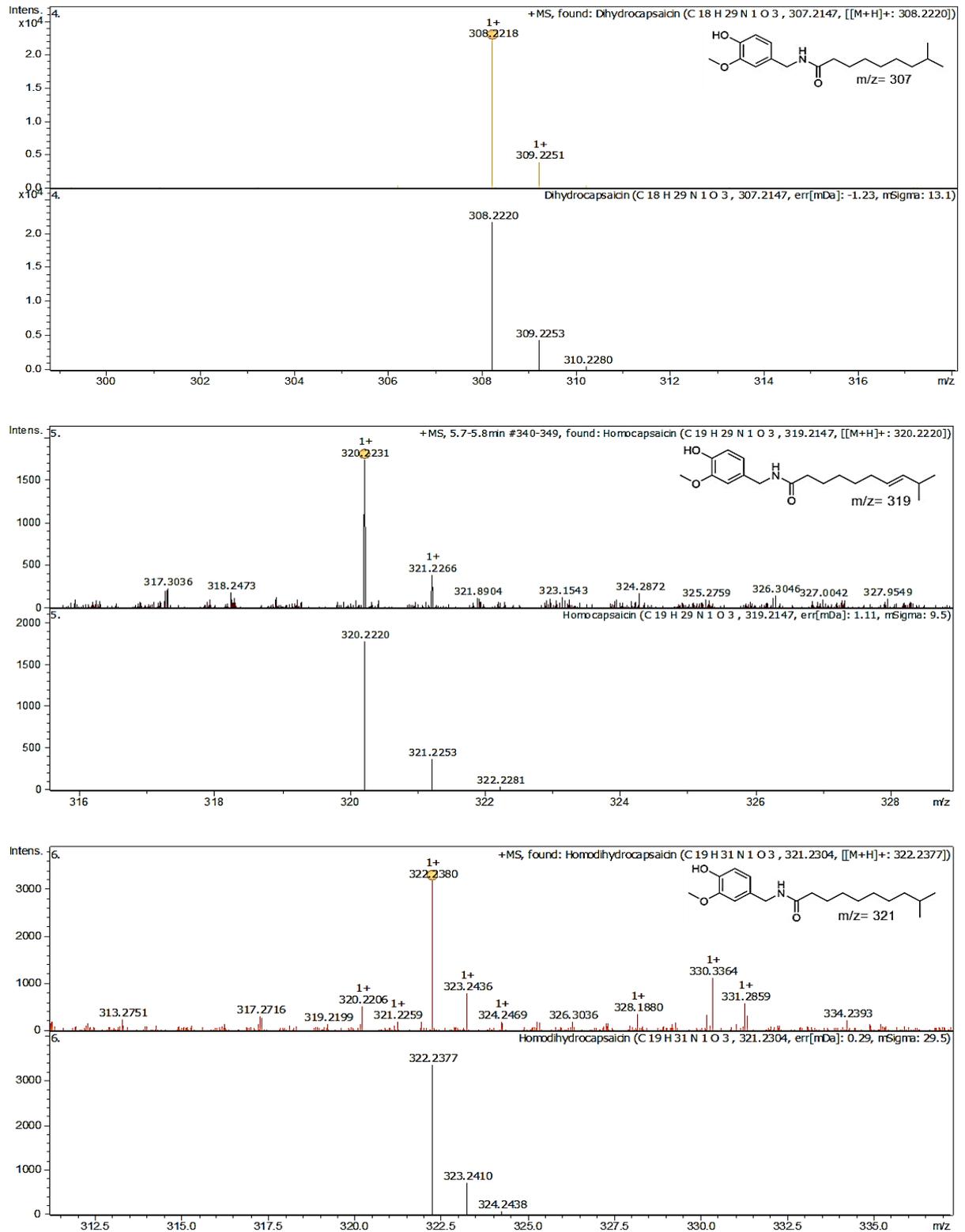
**Tabela 6-** Quantificação relativa dos capsaicinoides dos genótipos P28 e P61 identificados por UHPLC-MS/MS

tR (min.)	Composto		P28	P61
			%	
5,4	Nonivamida		7,99	8,91
5,4	Nordihidrocapsaicina		7,99	8,91
5,5	Capsaicina		45,06	59,52
5,7	Dihidrocapsaicina		32,80	19,70
5,7	Homocapsaicina		3,11	1,49
6,0	Homodihidrocapsaicina		3,06	1,48

tR- tempo de retenção



**Figura 17-** Espectro de massa experimental e teórico, respectivamente, da nonivamida, capsaicina e dihidrocapsaicina.



**Figura 18-** Espectro de massa experimental e teórico, respectivamente, da dihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina.

## 5. Considerações finais

Os dados obtidos no presente estudo evidenciam a variabilidade dos parâmetros físico-químicos e do teor de metabólitos entre os frutos de diferentes acessos de pimentas, demonstrando o potencial uso da coleção do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado para o melhoramento genético com diferentes objetivos, desde a seleção de materiais para o consumo *in natura* como para o processamento, visto que uma elevada quantidade de compostos fenólicos, carotenoides e capsaicinoides foram identificados.

Dentre os genótipos avaliados, os acessos P9, P50 e P246 apresentaram elevado teor de sólidos solúveis, entre 12,68 e 15,00 °Brix; os acessos P224, P287 e P203 maior acidez, entre 0,42 e 0,60 e os acessos P179, P197 e P27 maior pH, valores entre 6,43 e 6,51.

Os genótipos P119, P302 e P189 apresentaram elevado teor de compostos fenólicos entre 225,16 e 243,47 mg equivalente de ácido gálico/100 gramas em base úmida, já os acessos P287, P50 e P25, maior potencial antioxidante, entre 2,71 e 3,03 mmol equivalente Trolox/100mg em base úmida e os acessos P269, P280 e P179, elevado teor de carotenoides entre 53,42 e 54,11 equivalente mg de  $\beta$ -caroteno/100 gramas em base úmida, logo esses são potenciais candidatos para programas de melhoramento visando o desenvolvimento novas cultivares e produtos de pimenta com características de qualidade com potencial bioativo favoráveis ao consumidor.

De forma geral, os acessos P120, P246 e P236 destacaram-se dos demais genótipos avaliados por apresentarem maior teor de capsaicinoides (entre 6132,00 e 19543,70 mg/100g em base seca), em contraponto os acessos P14, P105 e P27 apresentaram menor concentração de capsaicinoides (inferior a 1,5 mg 100g<sup>-1</sup> de amostra em base seca). Logo são possíveis candidatos para programas de melhoramento visando o desenvolvimento novas cultivares, com o objetivo de fornecer ao mercado frutos ou produtos de alta ou baixa pungência, de acordo com o exigido pelo mercado consumidor.

Em relação a avaliação dos capsaicinoides o procedimento de extração desenvolvido neste estudo, apresenta-se como um método simples e rápido, além disso faz uso de menor quantidade de reagente quando comparado com os métodos tradicionalmente propostos. O método de quantificação otimizado apresentou baixos

limites de detecção, inferior a  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  para capsaicina e  $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$  para dihidrocapsaicina, baixos limites de quantificação, aproximadamente  $8 \text{ ng mL}^{-1}$  para capsaicina e  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  dihidrocapsaicina e também mostrou-se como um método reprodutível, uma vez que apresentou baixos desvios entre as análises realizadas em um mesmo dia e entre diferentes dias. O método validado foi aplicado com sucesso nos extratos das matrizes de *Capsicum* avaliadas.

A avaliação dos capsaicinoides pela técnica de UHPLC-MS/MS permitiu a confirmação inequívoca dos compostos avaliados por CLAE-FL e possibilitou a identificação de outros capsaicinoides incluindo nonivamida, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina também presentes no extratos de *Capsicum*.

**Agradecimentos**

Ao CNPq e a Secretaria de Ciência, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do Rio Grande do Sul pelo auxílio à pesquisa e à Capes pela concessão da bolsa.

## 6. Referências

- AJILA, C.M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; GODBOUT, V.; VALERO, J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n.3, p. 1–22, 2011.
- ALONI, B., KARNI, L., DEVENTURERO, G., TURHAN, E., AKTAS, H. Changes in ascorbic acid concentration, ascorbate oxidase activity, and apoplastic pH in relation to fruit development in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the occurrence of blossom rot. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. v.83, n.1, p.100-105, 2008.
- ANTONIOUS, G. F.; BERKE, T.; JARRET, R. L. Pungency in *Capsicum chinense*: variation among countries of origin. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.44, n.2, p.179-184, 2009.
- ANTONIOUS, G. F.; JARRET, R. L. Screening *Capsicum* accessions for capsaicinoids content. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.41, n.5, p.717-729, 2006.
- BAE, H.; JAYAPRAKASHA, G.K.; CROSBY, K.; JIFON, J. L.; PATIL, B.S. Extraction efficiency and validation of na HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v.130, p. 751-758, 2012.
- BARBIERI, RL; NEITZKE, RS; UENO, B. Agronegócio da pimenta no Rio Grande do Sul. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA**, Horticultura brasileira, v.29, n. 2, 2011.
- BARBERO, G. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column.. **Food Chemistry**, v.107, n.3, p. 1276-1282, 2008.
- BENKEBLIA, N. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. **Brazilian archives of biology and technology**, v.48, n.5, p. 753-759. 2005
- BENNETT, D. J.; KIRBY, G. W. Constitution and biosynthesis of capsaicin. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, n. 3, p. 442-446, 1968.
- BOROCHOV-NEORI, H.; JUDEINSTEIN, S.; TRIPLER, F.; HARARI, M.; GREENBERG, A.; SHOMER, I.; HOLLAND, D. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, n.3, p.189-195, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. D.; OSÓRIO, V. A. A.; AUGUSTIN, A. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CAREAGA, M.; FERNÁNDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; Hernandez-Sanchez, H. Antibacterial activity of Capsicum extract againsts *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beet meat. **International Journal Food Microbiology**, v.83, n.3, p.331-335, 2003.

CARVALHO, P.G.B.; MACHADO, C.M.M.; MORETTI, C.L.; FONSECA, M.E.N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.4, p.397-404, 2006.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Pimentas *Capsicum*. 1 ed. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 39-53, 2008.

CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; COTTER, J. L. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, n.4, p.340-345, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005. 785p.

CHOI, S. H.; SUH, B. S.; KOZUKUE, E.; KOZUKUE, N.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, n.24, p. 9024-9031, 2006.

CHUN, O.K., KIM, D. O., SMITH, N., SCHROEDER, D., HAN, J.T. AND LEE, C.Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.85, p. 1715-1724, 2005.

CHUNG, S.; CHAMPAGNE, E. T. Using phenolic compounds to reduce the allergenic properties of peanut extracts and peanut butter slurries. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, p. 249, n. 2, 2008.

COLLERA-ZÚÑIGA, O.; JIMÉNEZ, F.G.; GORDILLO, R. M. Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annum* L. **Food Chemistry**, v. 90, p. 109-114, 2005.

COLLINS, D., M.; WASMUND, L. M.; BOSLAND, P.W. Improved method for quantifying capsaicinoids in capsicum using high performance liquid chromatography. **Hortscience**, v. 30, p. 137-139, 1995.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Chemical and biological variability of CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANSAANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of

identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**. v.25, p. 469–495, 2011.

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-Hyphenated Techniques: Uses in the Structural Elucidation of Low and High Molecular Weight Compounds, In: **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**, 2006.

DAVIS, C. B.; MARKEY, C. E.; BUSCH, M. A.; BUSCH, K. W. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.15, p. 5925-5933, 2007.

DE MASI, L.; SIVIERO, P.; CASTALDO, D.; CAUTELA, D.; ESPOSITO, C.; LARATTA, B. Agronomic, chemical and genetic profiles of hot peppers (*Capsicum annuum* ssp.). **Molecular nutrition & food research**, v.51, n.8, p.1053-1062, 2007.

DELI, J., MOLNAR, P., MATUS, Z.; TOTH, G. Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening: biosynthesis of carotenoids in red paprika. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1517-1523, 2001.

DÍAZ, J.; POMAR, F.; BERNAL, Á.; MERINO, F. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum*. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.141-157, 2004.

DUARTE, C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; GOUVEIA, A.F.; COSTA, S.B.; LEITÃO, A.E.; BERNARDO-GIL, M.G. Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v.30, n.2, p.155-61, 2004.

DOYMAZ, I.; PALA, M. Hot-air drying characteristics of red pepper. **Journal Food Engineering**, v.55, p.331-335, 2002.

DUTTA, D.; CHAUDHURI, U., R.; CHAKRABORTY, R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.4. n.13, p.1510-1520, 2004.

ELWAN, M.W.M. AND EL-HAMAHMY, M.A.M. Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse peppers. **Scientia Horticulturae**, v.122, n. 4, p.521-526, 2009.

ESTRADA, B., F. POMAR, J. DÍAZ, F. MERINO, AND M.A. BERNAL. Pungency levels in fruits of the Padron pepper with different water supply. **Scientia Horticulturae**, v.81, n. 4, p. 385-396, 1999.

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

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 20 jul. 2013

FURTADO, A. A. L.; DUTRA, A. de S. Elaboração de molhos de pimentas. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 267, p. 52-56, 2012.

GARCÉS-CLAVER, A.; ARNEDO-ANDRÉS, M. S.; ABADÍA, J.; GIL-ORTEGA, R.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography- electrospray/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, n.25, p.9303-9311, 2006.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. 1 ed. New York: AVI 1991. 351p.

GUERRA, M.; MAGDALENO, R.; CASQUERO, P.A. Effect of site and storage conditions on quality of industrial fresh pepper. **Scientia Horticulture**. v.130, n.1, p.141-145, 2011.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed.; Oxford University Press: Oxford, 2007.

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

HOWARD, L. R.; WILDMAN, R. E. C. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2 ed. New York, Boca Raton, 2007. 538p.

JEONG, W.Y; JIN, J.S.; CHO, Y.A.; LEE, J.H.; PARK, S.; JEONG, S.W.; KIM, Y-H, LIM, C.S; EL-ATY, A.M.; KIM, G.S.; LEE, S.H.; SHIN, S.C. Determination polyphenols in three *Capsicum ANNUUM* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: They contribution to overall antioxidant and anticancer activity. **Journal Separation Science**, v. 34, n. 21, p. 2967-2974, 2011.

JUANGSAMOOT, J.; RUANGVIRIYACHAI, C.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chilli varieties by RP-HPLC-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C 18 cartridge. **International Food Research Journal**, v.19, n.3, p. 1217-1226, 2012.

KARNKA, R.; RAYANAKORN, M.; WATANESK, S.; VANNESORN, Y. Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. **Analytical Science**, v.18, n.6, p.661-665, 2002.

KEVERS, C., FALKOWSKI, M., TABART, J., DEFRAIGNE, J. -O., DOMMES, J. AND PINCEMAIL, J. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.21, p.8596-8603, 2007.

KOBATA, K., TODO, T., YAZAWA, S., LWAI, K.; WATANABE, T. Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a

nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.5, p.1695-1697, 1998.

KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; KOZUKUE, E.; LEE, S. J.; KIM, J. A.; LEE, K. R.; LEVIN, C.E; FRIEDMAN, M. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.23, p.9172-9181, 2005.

LANÇAS, M.; **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Paulo, Rima, 2004. 46p.

LANNES, S. D.; FINGER, F. L.; SCHUELTER, A. R.; CASALI, V. W. D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v.112, n. 3, p. 266-270, 2007.

LASKARIDOU-MONNERVILLE A. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electro kinetic capillary chromatography and its application to various species of *Capsicum*, Solanaceae. **Journal of Chromatography A**. v.838, n.1, p. 293-302, 1999.

LEE, Y.; HOWARD, L. R.; VILLALON, B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. **Journal of Food Science**. v. 60, n.3, p.473-476, 1995.

LIGHTBOURN, G. J.; GRIESBACH, R. J.; NOVOTNY, J. A.; CLEVIDENCE, B. A.; RAO, D. D.; STOMMEL, J. R. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum*. **Journal of Heredity**, v.99, n.2, p.105-11, 2008.

LIU, A.; HAN, C.; ZHOU, X.; ZHU, Z.; HUANG, F.; SHEN, Y. Determination of three capsaicinoids in *Capsicum annuum* by pressurized liquid extraction combined with LC-MS/MS. **Journal of Separative Science**. v.36, n. 5, p. 857-862, 2013.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric determination of capsaicin and some of its analogues from chili peppers (*Capsicum* spp.). **Journal of AOAC International**, v. 82, n.6, p.1399-1405, 1999.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 5, p. 370-374, 2007.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, n. 5, p.1750-1756, 2005.

MATSUFUJI, H.; NAKAMURA, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p. 3468-3472, 1998.

MAZIDA, M.M.; SALLEH, M.M; OSMAN, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum ANNUUM*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). **Journal of Food Composition and Analysis**. v.8, n.5, p.427-437, 2005.

McCARTY, T. I. B. **Monitoring of U\$ imports of peppers**, United States International Trade Commission (USITEC), 2008.

MEGHAVANSI, M. K.; SIDDIQUI, S.; HANNEEF K. Md. H.; GUPTA, V. K.; VAIRALE, M. G.; GOGOI, H. K.. SINGHA, L. Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. **Journal of Ethnopharmacology**. v.132, n.1, p. 1-14, 2010.

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M.R; CONFORTI, F; STATTI, G; DE CINDIO, B; HOUGHTON, P.J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense Jacq. cv. Habanero*. **Food Chemistry**, v.114, n.2, p.553-560, 2009.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n.10, p. 1616-1620, 1993.

MONTEIRO, E. R. **Identificação botânica e divergência genética em pimentas do gênero *Capsicum* spp.** 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

MOURA, M. C. C. L.; GONÇALVES, L. S. A.; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; JÚNIOR, A. T. A.; PEREIRA, T. N. S. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira**. v. 28, n.2, p.155-161, 2010.

NEITZKE R. Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* – explorando a multiplicidade de usos. 2012. 115f. Tese (Doutora em Ciências, Área de conhecimento: Fitomelhoramento)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

NEITZKE, R.S.; BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G.; CASTRO, C.M. Divergência genética entre variedades locais de *Capsicum baccatum* utilizando caracteres multicategóricos. **Magistra**, v. 20, n.1, p. 249-255, 2008.

NUEZ, F. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1995.

OCHI, T.; TAKAISHI, Y.; KOGURE, K.; YAMAUTI, I. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. **Journal Natural Products**.v.66, n.8, p. 1094-1096, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIN, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp.** 2011. 80f. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

OLIVEIRA, A. B. de; SILVA, A. M. da; LOPES, C. A.; RIBEIRO, C. S. da C.; LOPES, D.; CRUZ, D. M. R.; MARQUES, D. M. C.; FRANÇA, F. H.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; BUSO, G. S. C.; BRANCHETTI, L. de B.; FERREIRA, M. E.; POZZOBON, M. T.; RESENDE, R. de O.; CARVALHO, S. J. C. de; PINHEIRO, V. L.; CASALI, V. W. D. *Capsicum* pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa, 2000. 113p.

OLIVER, J.; PALOU, A.; PONS, A. Semi-quantification of carotenoids by highperformance liquid chromatography: saponification-induced losses in fatty foods. **Journal Chromatography A**, v. 829, n.1, p. 393-399, 1998.

OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H.; LYR, H.; RUSSEL, P.E.; DEHNE, H.W.; SISLER, H.D. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by foliar phosphate application. In: INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN SYMPOSIUM, 12., 1999, Thuringia. **Modern fungicides and antifungal compounds II**. Thuringia: International Reinhardsbrunn Symposium, p.339-348, 1999.

PALEVITCH, D.; CRAKER, L. E. Nutritional and medical importance of red pepper (*Capsicum* spp.). **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. v.3, n.2, p.55-83, 1995.

PARK, S.; JEONG, W. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; JEONG, S. W.; KIM, G. S.; BAE, D. W.; LIM, C. S.; JIN, J. S.; LEE, S. J.; SHIN, S. C.. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.130, n.4, p. 981-985, 2012.

PEÑA-ALVAREZ, A.; ALVARADO, L. A.; VERA-AVILA, L. E. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Instrumentation Science & Technology**. v 40, n.5, p. 429-440, 2012

PEREIRA, G. M.; FINGER, F. L.; CASALI, V. W. D.; BROMMONSCHENKEL, S. H., Influência do tratamento com etileno sobre o teor de sólidos solúveis e a cor de pimentas. **Bragantia**, v.67, n.4, p.1031-1036, 2008.

PERUCKA, I.; MAZGORZATA, M. Antioxidant vitamin contents of *Capsicum annuum* fruit extracts as affected by processing and varietal factors. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 6, n.4, p. 67–74, 2007.

- PINO, J.; GONZÁLEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURIÓN-YAH, A. R.; TRUJILLO-AGUIRRED J.; LANTOUNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack) cultivars grown in Yucatan. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1682-1686, 2007.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2, p. 97-111, 2006.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**.v.533, p.222-239, 2006.
- REIF, C.; ARRIGONI, E.; SCHÄRER, H.; NYSTRÖM, L.; HURRELL, R. F. Carotenoid database of commonly eaten Swiss vegetables and their estimated contribution to carotenoid intake. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.29, n.1, p. 64-72, 2013.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa, 2000. 113p.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; RIBEIRO, C.S.C. Cultivo. In: RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.M.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Ed.). **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa, p. 11-14, 2008.
- REYES-ESCOGIDO, M. L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E. G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and pharmacological aspects of Capsaicin. **Molecules**, v.16, p.253-1270, 2011.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p.771-180, 2004.
- RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Genética e melhoramento. In: RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER; F.J.B. (Org.). **Pimentas Capsicum**. Brasilia: Embrapa, p. 55-69, 2008.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, n. 7, p.933-956, 1996.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, 2001. 64p
- RODRIGUEZ-URIBE, L.; GUZMAN, I.; RAJAPAKSE, W.; RICHINS, R. D.; O'CONNELL, M. A. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum*

*annuum* fruit, regulated at multiple levels. **Journal of experimental botany**, v.63, n.1, p. 517-526, 2012.

ROSA, A.; DEIANA, M.; C. S. U, V.; PACCAGNINI, S.; APPENDIDO, G.; BALLERO, M.; DESSI, A. Antioxidant Activity of Capsinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.25, p. 7396-7401, 2002.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 235, p. 7-15, 2006.

RUSSO, V. M. **Peppers: Botany, Production and Uses**. Oklahoma, CABI, 2012. 220p.

RYAN, D.; ROBAR, D.S. K.; ENZIER, P., ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **Trends in Analytical Chemistry**, v.18, n.5, p.362-372. 1999.

SADASIVAM, S.; MANIKKAM, A. Capsaicin. In: **Biochemical methods for agricultural sciences**. New Delhi: Wiley Eastern Limited, p. 193-194, 1992.

SCHULZE, B.; SPITELLER, D. Capsaicin: tailored chemical defence against unwanted "frugivores". **ChemBiochem**, v.10, n.3, p. 428-429, 2009.

SCOVILLE, W. L. Note on capsicums. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.1, n. 5, p. 453-454, 1912.

SEGATTO, F. B. **Avaliação da qualidade "Pós-Produção" de pimenta ornamental (*Capsicum ANNUUM*) cultivada em vaso**. 2007. 88f. Tese (Doutorado em Scientiae)- Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SHWEIGGERT, U.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, n.3, p. 217-224, 2006.

SCHULZE, B.; SPITELLER, D. Capsaicin: tailored chemical defence against unwanted "frugivores". **ChemBioChem**, v.10, n.3, p.428-429, 2009.

SINGH, S.; JARRET, R.; RUSSO; V.; MAJETICH; G.; SHIMKUS, J.; BUSHWAY, R., PERKINS, B. Determination of capsinoids by HPLC-DAD in *Capsicum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n.9, p.3452-3457, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIENCIA DO SOLO. 2004. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porto Alegre: Comissão de Química e Fertilidade do Solo. 394p.

SOLOVCHENKO, A. Photoprotection in Plants: **Optical Screening-Based Mechanisms**. 2012.

SORIANO, S. **Avaliação de diferentes estratégias para o tratamento de amostras de suplementos multivitamínicos/multiminerais visando a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.** 2006. 101f. Dissertação (Mestre em Química- Área de concentração Química Analítica) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Fluminense, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

SREERAMULU, D.; RAGHUNATH, M. Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. **Food Research International**, v.43, n.4, p.1017-1020, 2010.

SUNG, Y.; CHANG, Y. Y.; TING, N.L. Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v.46, n.1, p.35-42, 2005.

SURH, Y.J.; LEE, E.; LEE, J. M. The Capsaicin Study. **Mutation Research**. v.41, n.1, p.259-267, 2002.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**. Oxford, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TAM, S. M.; LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; SAGE-PALLOIX, A. M.; MHIRI, C.; GRANDBASTIEN, M. A. LTR-retrotransposons Tnt1 and T135 markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.119, n.6, p. 973-989, 2009.

TEWKSBURY, J. J.; NABHAN, G. P. Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chillies. **Nature**, v. 412, n.6845, p. 403-404, 2001.

THAPA, B.; SKALKO-BASNET, N.; TAKANO, A.; MASUDA, K.; BASNET, P. HPLC analysis of capsaicin content in sixteen *Capsicum* fruits from Nepal. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n.4, p. 908-913, 2009.

TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; VIEIRA, T. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A.; ALENCAR, S. M. Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.7, p. 8943-8957, 2012.

TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. **Journal Food Composition and Analysis**.v. 20, n.7, p.596-602, 2007.

VALVERDE R.M.V. **Composição bromatológica da pimenta malagueta in natura e processada em conserva.** 2011. 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Engenharia de Processos de Alimentos, UESB, 2011.

VASCONCELOS, C. S. **Avaliação agrônômica e caracterização da produção de compostos bioativos em variedades crioulas de pimentas (*Capsicum***

**baccatum**). 2012. 62f. Dissertação (Mestre em Ciências)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VEIGA, R.F.A. **Banco de germoplasma: Acervo dos bancos de germoplasma do estado de São Paulo**, p. 106-109. Campinas, 1999.

VISWANATH, V.; UROOJ, A.; MALLESHI, N. G. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols (*Eleusine coracana*). **Food Chemistry**, v.114, n.1, p.340-346, 2009.

VOTAVA, E. J.; NABHAN, G. P.; BOSLAND, P. W. Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in situ population and ex situ accessions of chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). **Conservation Genetics**, v. 3, n. 2, p. 123-29, 2002.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A-R; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R.J.; BOVY, A. G.. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. **Phytochemistry**, v. 72, n.11, p. 1358-1370, 2011.

WALL, M. M.; BOSLAND, P. W. Analytical methods for color and pungency of chiles (*Capsicums*). In: D. WETZEL, & G. CHARALAMBOUS, **Instrumental methods in food and beverage analysis**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 347-373.

WEISSENBERG, M.; SCHAEFFLER, I.; MENAGEM, E.; BARZILAI, M., LEVY, A. Isocratic non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of capsanthin and capsorubin in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin. **Journal of Chromatography A**, v. 757, n. 1, p. 89-95, 1997.

ZECHMEISTER, L.; POLGAR, A. cis-trans Isomerization and spectral characteristics of carotenoids and some related compounds. **Journal of the American Chemical Society**. v. 65, n.8, p.1522-1528, 1943.

ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P. W. Capsaicinoid inheritance in an interspecific hybridization of *Capsicum ANNUUM* x *C. chinense*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.125, n. 4, p. 448-453, 2000.

ZIMMER, A.R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVERA, J.R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, n.1, p. 228-233, 2012.