

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL E ESTUDO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM PIMENTAS DO GÊNERO *CAPSICUM*.**

Stanislau Bogusz Junior

*Farmacêutico e Bioquímico
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos*

Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Prof^a. Dra. Cláudia Alcaraz Zini

Coorientador (IQ-UFRGS)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de
Alimentos.

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B634c	Bogusz Junior, Stanislau Caracterização química da fração volátil e estudo do potencial antioxidante em pimentas do gênero <i>Capsicum</i> / Stanislau Bogusz Junior. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.
	Orientador: Helena Teixeira Godoy Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos
	1. <i>Capsicum</i> . 2. Voláteis. 3. Antioxidantes. 4. Cromatografia. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
	(cars/fea)

Título em inglês: Chemical characterization of volatiles compounds and study of antioxidant potential in *Capsicum* chili peppers

Palavras-chave em inglês (Keywords): Capsicum, volatiles, antioxidants, chromatography

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder

Juliana Azevedo Lima Pallone

Mário Roberto Maróstica Junior

Roger Wagner

Data de defesa: 10/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese de doutorado defendida em 10/03/2010 por Stanislau Bogusz Junior. Aprovada pela comissão julgadora em 10/03/2010.

Prof^a. Dr^a. Helena Teixeira Godoy

UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Juliana Azevedo Lima Pallone

UNICAMP

Dr^a. Cláudia Hoffmann Kowalski

LANAGRO

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

UNICAMP

Prof. Dr. Roger Wagner

UFSM

Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

UEM

Dr^a. Regina Prado Zanes Furlani

ITAL

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

UNICAMP

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

Marcel Proust

Dedico este trabalho a meus familiares,
a todos os professores e colaboradores, que
de alguma forma contribuíram com minha
formação em pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos, por possibilitar a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À Prof^a Helena Godoy pela valiosa orientação, pela paixão científica, por acreditar que esse trabalho poderia se tornar realidade, e por acompanhar cada passo com objetividade, conhecimento e perseverança;

À Prof Claudia Alcaraz Zini, do Instituto de Química da UFRGS, pela inestimável colaboração e oportunidade de trabalho no Núcleo Multi-usuário de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC x GC);

Aos Membros da banca examinadora pelo auxílio na correção, sugestões e críticas;

Aos Professores: Délia Rodriguez Amaya, Maria Isabel Rodrigues, Marcelo Alexandre Prado, Juliana Pallone, Fábio Gozzo, Roy Edwards Bruns, Fábio Augusto e Carin von Mühlen, pelos ensinamentos compartilhados;

Aos funcionários do Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos Cristina, Gislaine e seu Dirceu.

Aos meus colegas de Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos: Adriana, Ciça, Carlos, Carol, Cíntia, Cristiano, Dani Pane, Dani Ferreira, Daniele Rodrigues, Elede, Jéssica, Joyce, Luciúla, Merenice, Paula, Pedro, Pollyane, Raquel, Talita e Vivian.

Aos amigos Cedenir Quadros, Cristiano Ragarin, Cíntia Kabori, Cláudia H. K. Schroder, Edsom Toneto, Lísia H. Senger, Paulo Campagnol e Roberta Drekenner, pelo apoio, parcerias, coleguismo, boas risadas nos momentos de descontração e convívio durante todo esse tempo;

Ao Fábio Barros, Rodrigo Scherer e Roger Wagner, agradeço em especial;

A minha companheira Fernanda, pelo amor, carinho, dedicação, entusiasmo, bom humor, acertividade e energia. Fer, sem dúvida alguma sua contribuição foi imprescindível para a execução deste trabalho.

A minha família pelo incentivo, confiança e apoio incondicional;

Claro que não cabem todos aqui, mas saibam que na memória e no coração tem lugar de sobra para lembrar de todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta história...

... MUITO OBRIGADO !

Stanislau Bogusz Junior

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	xiii
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL	xxi
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
COMPOSTOS BIOATIVOS EM PIMENTAS <i>CAPSICUM</i>	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Capsaicinóides	4
1.1.1. <i>Análise química de Capsaicinóides</i>	8
1.2. Compostos voláteis em pimentas	10
1.2.1. <i>Funções biológicas dos compostos voláteis</i>	10
1.2.2. <i>Rotas biossintéticas de voláteis</i>	13
1.2.2.1. <i>Compostos voláteis derivados de carboidratos</i>	13
1.2.2.2. <i>Derivados de ácidos graxos e outros voláteis lipofílicos</i>	16
1.2.2.3. <i>Compostos voláteis derivados de aminoácidos</i>	18
1.2.2.4. <i>Compostos de impacto para o flavor</i>	18
1.2.3. <i>Caracterização química de voláteis em Capsicum</i>	19
1.3. Capacidade antioxidante de <i>Capsicum</i>	23
1.3.1. <i>Estresse oxidativo e propriedades antioxidantes de pimentas Capsicum</i>	23
1.3.2. <i>Compostos fenólicos totais</i>	27
1.3.3. <i>Seqüestro do radical livre DPPH[•]</i>	29

1.3.4. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	30
2. CONCLUSÕES	32
3. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2.....	41
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PIMENTAS CAPSICUM POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	41
ABSTRACT.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1. Amostras.....	45
2.2. Preparo das amostras e procedimentos de SPME.....	45
2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC-FID).....	47
2.4. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS).....	47
2.5. Estratégia de otimização	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 3.....	63
ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM PIMENTAS MALAGUETA (CAPSICUM FRUTESCENS), DEDO-DE-MOÇA (CAPSICUM BACCATUM VAR. PENDULUM) E MURUPI (CAPSICUM CHINENSE) EM DOIS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO, POR SPME E GC/MS.....	63

ABSTRACT.....	64
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1. Amostras.....	66
2.2. Preparo das amostras.....	67
2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC-FID).....	68
2.4. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS).....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
3.1. Voláteis em pimenta malagueta	70
3.2. Voláteis em pimenta dedo-de-moça	75
3.3. Voláteis em pimenta murupi.....	78
4. CONCLUSÕES	83
5. REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO 4.....	87
ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DE PIMENTAS <i>CAPSICUM</i> DO BRASIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE/ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR TEMPO DE VOO (GCXGC/TOFMS)	87
ABSTRACT.....	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	93
2.1. Amostras.....	93
2.2. Preparo das amostras.....	93
2.3. GCxGC-FID.....	94

2.4. GCxGC/TOFMS	95
2.5. Análise estatística	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.1. Desenvolvimento de método cromatográfico por GCxGC-FID	98
3.2. Análises dos voláteis de pimentas <i>Capsicum</i> por GCxGC/TOFMS	99
3.3. Análise dos componentes principais (PCA)	110
4. CONCLUSÕES	112
5. REFERÊNCIAS.....	113
CAPÍTULO 5.....	117
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS PIMENTAS MALAGUETA (<i>CAPSICUM FRUTESCENS</i>), DEDO-DE-MOÇA (<i>CAPSICUM BACCCATUM</i> VAR. <i>PENDULUM</i>) E MURUPI (<i>CAPSICUM CHINENSE</i>)	117
ABSTRACT.....	118
1. INTRODUÇÃO	119
2. MATERIAIS E MÉTODOS	121
2.1. Amostras.....	121
2.2. Preparo das amostras.....	121
2.3. Compostos fenólicos totais (CFT)	122
2.4. Ação antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	122
2.5. Ação antioxidante pelo método do radical livre DPPH•	123
2.6. Análise estatística	124
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1. Rendimentos de extração.....	124

3.2. Compostos fenólicos totais (CFT)	126
3.3. Ação antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).....	128
3.4. Ação antioxidante pelo método do radical livre DPPH°	130
3.5. Correlação entre os teores de CFT, FRAP e DPPH°	133
4. CONCLUSÕES	135
5. REFERÊNCIAS.....	136
CONCLUSÕES GERAIS	139
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	141

RESUMO GERAL

Nos últimos anos, no Brasil, o volume das exportações de pimentas *Capsicum* aumentou significativamente, fato que fez com que este produto agrícola se posicionasse como a segunda principal hortaliça exportada pelo país. Acredita-se que o crescimento nas exportações de pimentas esteja relacionado à afeição do mercado por este condimento que é amplamente empregado em formulações alimentícias industrializadas ou caseiras em diversos países. Além disso, a indústria de alimentos as emprega largamente como agente colorante e flavorizante em molhos, sopas, carnes processadas, lanches, doces e bebidas alcoólicas. Dada esta ampla utilização, pode-se considerar os caracteres sensoriais, proporcionados pelas pimentas, como um fator importante na qualidade sensorial dos alimentos que as empregam em suas formulações.

Neste trabalho, o objetivo foi analisar a fração volátil e a fixa de três variedades de pimentas *Capsicum* brasileiras: malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*) em dois estádios de maturação (tecnológica e comercial). Para a fração volátil foi empregada microextração em fase sólida do espaço de cabeça (HS-SPME, “*Headspace-Solid Phase Microextraction*”). Foram testadas as fibras: carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS-75µm), polidimetilsiloxano (PDMS-100µm), divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS-65µm), carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB-70µm), e divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS-50/30µm), sendo que, esta última foi a que apresentou melhor eficiência na captura dos voláteis.

Para esta fibra foram otimizadas as condições de extração utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR).

Empregando-se as condições ótimas de extração por HS-SPME e cromatografia gasosa (GC, “*Gas Chromatography*”) hifenada a detector de ionização em chama (FID, “*Flame Ionization detector*”) e espectrometria de massas (MS, “*Mass Spectrometry*”), um total de 83 voláteis foram identificados na pimenta malagueta, em sua maioria ésteres e alcoóis; enquanto que na pimenta dedo-de-moça foram identificados 50 voláteis, em sua maioria monoterpenos e sesquiterpenos e na pimenta murupi foram identificados 79 voláteis, em sua maioria ésteres e sesquiterpenos. Também foi verificada uma diminuição das áreas dos picos dos voláteis nas três amostras, com o processo de maturação, principalmente nas amostras de pimenta dedo-de-moça, na qual a maioria dos voláteis desapareceu com o amadurecimento.

Para a análise das frações voláteis das pimentas, também foram desenvolvidas e otimizadas metodologias de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC, “*Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*”) hifenada aos detectores FID e espectrometria de massas por tempo de voo (TOF/MS, “*Time of Flight Mass Spectrometry*”). Através destas técnicas multidimensionais um total de 220 compostos voláteis foi identificado (125 em pimenta malagueta, 123 em murupi e 75 em dedo-de-moça), destes compostos, 24 apresentaram potencial para discriminação das amostras e foram utilizados na análise de componentes principais (PCA). Os resultados do PCA permitiram discriminar as amostras entre si e também segundo seus estádios de maturação. As amostras de pimenta malagueta foram discriminadas principalmente por

compostos pertencentes ao grupo dos ésteres ramificados; a pimenta murupi, por sesquiterpenos e a pimenta dedo-de-moça pela presença de aldeídos e metoxipirazina.

Além disso, foi avaliado o potencial antioxidante das frações fixas das três pimentas, também em diferentes estádios de maturação e em diferentes épocas do ano. Nas análises foram empregados os ensaios de compostos fenólicos totais (CFT) por Folin-Ciocalteu, e atividade antioxidante pelos métodos de redução do ferro (FRAP- "*Ferric Reducing Antioxidant Power*") e de seqüestro do radical livre DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Os maiores valores de CFT foram observados para as amostras imaturas do primeiro ano sendo que os valores médios de fenólicos totais aumentaram com o amadurecimento de todas as pimentas investigadas. Verificou-se também a existência de correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de ação antioxidantes, sendo que, esta correlação foi maior para o método de FRAP do que para o de DPPH, provavelmente em função das particularidades de estereoquímica destes ensaios antioxidantes.

ABSTRACT

In the last years, in Brazil, the exportations of chili peppers has increased significantly, therefore, this agricultural product became the second largest vegetable exported by the country. It is believed, that growth in exports of chili peppers is related to the greed of the market for this spice that is widely used in food formulations in many different countries. Moreover, the food industry employs the chili peppers as coloring and flavoring agent in sauces, soups, processed meats, snacks, sweets and beverages. Given this widespread use can be considered the characters provided by the sensory chili peppers as an important factor in the sensory quality of food.

The aim of this study was to evaluate the volatile and fixed fractions of three varieties of Brazilian chili peppers: “malagueta” (*Capsicum frutescens*), “dedo-de-moça” (*Capsicum baccatum* var. *Pendulum*) and “murupi” (*Capsicum chinense*) in two stages of maturation (technological and commercial). For the volatile fraction was used headspace-solid phase microextraction (HS-SPME). For the extraction phase, five fibers were tested: carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS-75 μ m), polydimethylsiloxane (PDMS-100 μ m) divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS-65 μ m), carbowax/divinylbenzene (CW/DVB-70 μ m), and divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS-50/30 μ m) that showed be the more efficient fiber in trapping the volatiles compounds. The optimization of the extraction conditions was carried out using multivariate strategies such as factorial design and response surface methodology.

Using the optimal extraction by HS-SPME and gas chromatography (GC) detector coupled with flame ionization (FID) and mass spectrometry (MS), a total of

83 compounds were identified in *malagueta*, mostly esters and alcohols, while in *dedo-de-moça* 50 compounds were identified, mostly monoterpenes and sesquiterpenes and in *murupi* 79 compounds were identified, mostly esters and sesquiterpenes. Moreover, a decrease of peak areas with the maturation process of compounds was observed in the three samples, especially in samples of *dedo-de-moça*, in which most of the compounds disappeared during ripening.

In the present work, methods for comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) coupled to FID detectors and mass spectrometry time of flight (TOF/MS) were developed and optimized for the analysis of volatile fractions of chili peppers. Through these multidimensional techniques a total of 220 volatile compounds were identified, these compounds, 24 showed potential to discriminate the samples and were used in principal component analysis (PCA). The results of PCA show variability among samples and also according to their maturation stages. Samples of *malagueta* were discriminated mainly by compounds belonging to the group of branched esters, the *murupi*, by sesquiterpenes and the *dedo-de-moça* by the presence of aldehydes and methoxypyrazine.

Also, in this study the antioxidant potential of fixed fractions of three peppers was evaluated, also in different stages of maturation and in different seasons. For analysis, the tests of total phenolic compounds (CFT) by Folin-Ciocalteu and antioxidant activity by the methods of reduction of iron (FRAP, "Ferric Reducing Antioxidant Potential) and DPPH[•] radical scavenging assay. (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were used. The highest values of CFT were observed for the immature samples of the first year and the medium values of total fenólicos

increased with the ripening of all of the investigated peppers. The existence of positive correlations between the results of CFT and the antioxidant action methods was also verified, and, this correlation went larger for the method of FRAP than for the one of DPPH, probably in function of the particularities of stereochemistry of these antioxidant assays.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um importante centro de diversidade genética de pimentas *Capsicum*. Estas são consideradas uma cultura de grande importância sócio-econômica, pois contribuem como fonte geradora de renda e para a fixação de pessoas na área rural, gerando empregos diretos e indiretos. Seu mercado é bastante diversificado, indo desde a comercialização para consumo in natura e conservas caseiras até a exportação do produto industrializado. Porém, cabe ressaltar que no Brasil poucos estudos relativos à caracterização química de pimentas do gênero *Capsicum* têm sido realizados.

As caracterizações químicas de alimentos ou de matérias primas alimentícias são de grande importância para a ciência de alimentos, uma vez que é através destas que se pode compreender a natureza dos diferentes constituintes dos alimentos, os processos químicos e bioquímicos envolvidos com suas transformações, os fenômenos relacionados ao armazenamento e processamento destes bem como seus atributos de qualidade.

Este trabalho, portanto, teve como objetivos: (a) desenvolver, otimizar e aplicar metodologias analíticas de cromatografia gasosa mono e bidimensionais acoplada a espectrometria de massas para a caracterização da fração volátil de três variedades de pimentas *Capsicum*; (b) avaliar os compostos fenólicos totais e o poder antioxidante nas frações fixas destas pimentas, (c) verificar o efeito da maturação na fração volátil e no poder antioxidante das amostras analisadas.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **COMPOSTOS BIOATIVOS EM PIMENTAS *CAPSICUM***

Stanislau Bogusz Junior¹ & Helena Teixeira Godoy¹

Artigo segundo as normas de publicação 2009 da revista Química Nova.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6121, Campinas – SP, Brasil.

ABSTRACT

BIOACTIVE COMPOUNDS IN CAPSICUM CHILI PEPPERS: this paper presents a review of the main chemical compounds related to pungency, aroma and antioxidant properties of this spices. Information about biosynthetic routes of the main chemical compounds in plant tissues, as well as the functions they have in plants and other biological systems were presented in this paper. Moreover, some analytical techniques most commonly used for identification and quantification of chemical components related to quality and antioxidant power of chili peppers samples were also presented.

Keywords: Capsicum, capsaicinoids, volatiles compounds and antioxidant power.

1. INTRODUÇÃO

Com a chegada dos navegadores portugueses e espanhóis ao continente americano, muitas espécies de plantas tornaram-se conhecidas, entre elas as pimentas do gênero *Capsicum*. Essas, já na época dos navegadores, eram utilizadas pelos nativos, mostrando-se mais picantes (pungentes) que a conhecida pimenta-do-reino ou pimenta-negra, do gênero *Piper*, o que gerou o interesse dos navegadores que as incluíram entre suas especiarias e as disseminaram, mais tarde, em locais como a África, Europa e posteriormente na Ásia.¹

Estas especiarias, assim como os pimentões, pertencem à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*. Este gênero possui de 20 a 25 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação. Destaca-se no Brasil, a existência de ampla diversidade em todas as categorias, sendo quatro espécies domesticadas: *Capsicum annuum* var. *annuum*; *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; *Capsicum chinense*; *Capsicum frutescens* e três espécies semi-domesticadas: *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*; *Capsicum baccatum* var. *praetermissum* e *Capsicum baccatum* var. *baccatum*.²

Como principais estados brasileiros produtores de pimenta destacam-se Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul.³ Segundo dados da EMBRAPA, no ano de 2004 o volume das exportações brasileiras de pimentas do gênero *Capsicum* atingiu 8.479 toneladas; já em 2005, o volume de exportações de pimentas deste mesmo gênero foi de 9.222 toneladas, fato que fez com que este produto agrícola se posicionasse como a segunda principal hortaliça exportada pelo país, representando uma contribuição de 13,5% no valor total das exportações brasileiras de hortaliças.^{4,5}

Acredita-se que o crescimento nas exportações de pimentas esteja relacionado à afeição do mercado por este condimento que é largamente empregado em formulações alimentícias industrializadas ou caseiras nos mais diversos países, especialmente pelo fato de conferirem distintas características de pungência, aromas e cores aos mais diversos pratos, revelando sabores típicos de determinadas regiões.^{6, 7, 8} Além disso, a indústria de alimentos as emprega largamente como agente colorante e flavorizante em molhos, sopas, carnes processadas, lanches, doces e bebidas alcoólicas.⁹ Dada esta ampla utilização pode-se considerar os caracteres sensoriais proporcionados pelas pimentas como fator importante na qualidade sensorial dos alimentos.

Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar um estudo sobre os principais constituintes químicos de pimentas *Capsicum*, descrevendo algumas das principais metodologias analíticas para suas determinações.

1.1. Capsaicinóides

Dentre os caracteres sensoriais das pimentas, a pungência tem destaque especial, principalmente por este ser um dos motivos de aceitação ou rejeição de alimentos flavorizados com esta especiaria. A pungência é produzida por um conjunto de alcalóides denominados de capsaicinóides, estes ocorrem apenas no gênero *Capsicum* geralmente em glândulas presentes na placenta dos frutos.³ São produzidos pela reação de condensação entre a vanililamina, proveniente da via dos fenilpropanóides, e ácidos graxos de C₉-C₁₁, obtidos a partir da valina e leucina.¹⁰ Os principais capsaicinóides encontrados em *Capsicum* são a capsaicina, diidrocapsaicina e nordiidrocapsaicina, e as diferenças entre estes

estão relacionadas à presença de diferentes cadeias carbonadas, isaturações ou ramificações nos ácidos graxos que entram nas suas rotas de biossíntese. ¹¹ Na Figura 1 pode-se observar as estruturas químicas destes três capsaicinóides responsáveis por mais de 90% da pungência das pimentas. ^{12-16.}

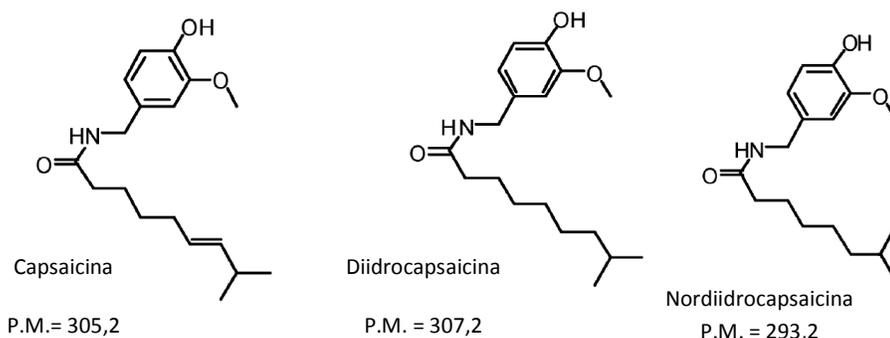


Figura 1. Estruturas químicas e peso molecular dos principais capsaicinóides responsáveis pela pungência de pimentas *Capsicum*. Adaptado de Garcés-Claver et al. ¹⁶

Os capsaicinóides apresentam efeito diferenciado quanto à sensação de pungência. Dentre os três principais, a nordiidrocapsaicina é o menos irritante e sua sensação de ardor é imediatamente percebida após a ingestão da pimenta, na frente da boca e no palato, sendo rapidamente dissipada. Já a capsaicina e a diidrocapsaicina causam maior irritação e são descritas como ardor no meio da boca, palato, garganta e na parte posterior da língua. ¹⁷ Diferentes combinações desses alcalóides produzem diferentes características de ardência em diferentes variedades de *Capsicum*. A literatura descreve a existência de mais de 10 análogos aos capsaicinóides descritos anteriormente e alguns podem ser visualizados na Figura 2. ¹⁸

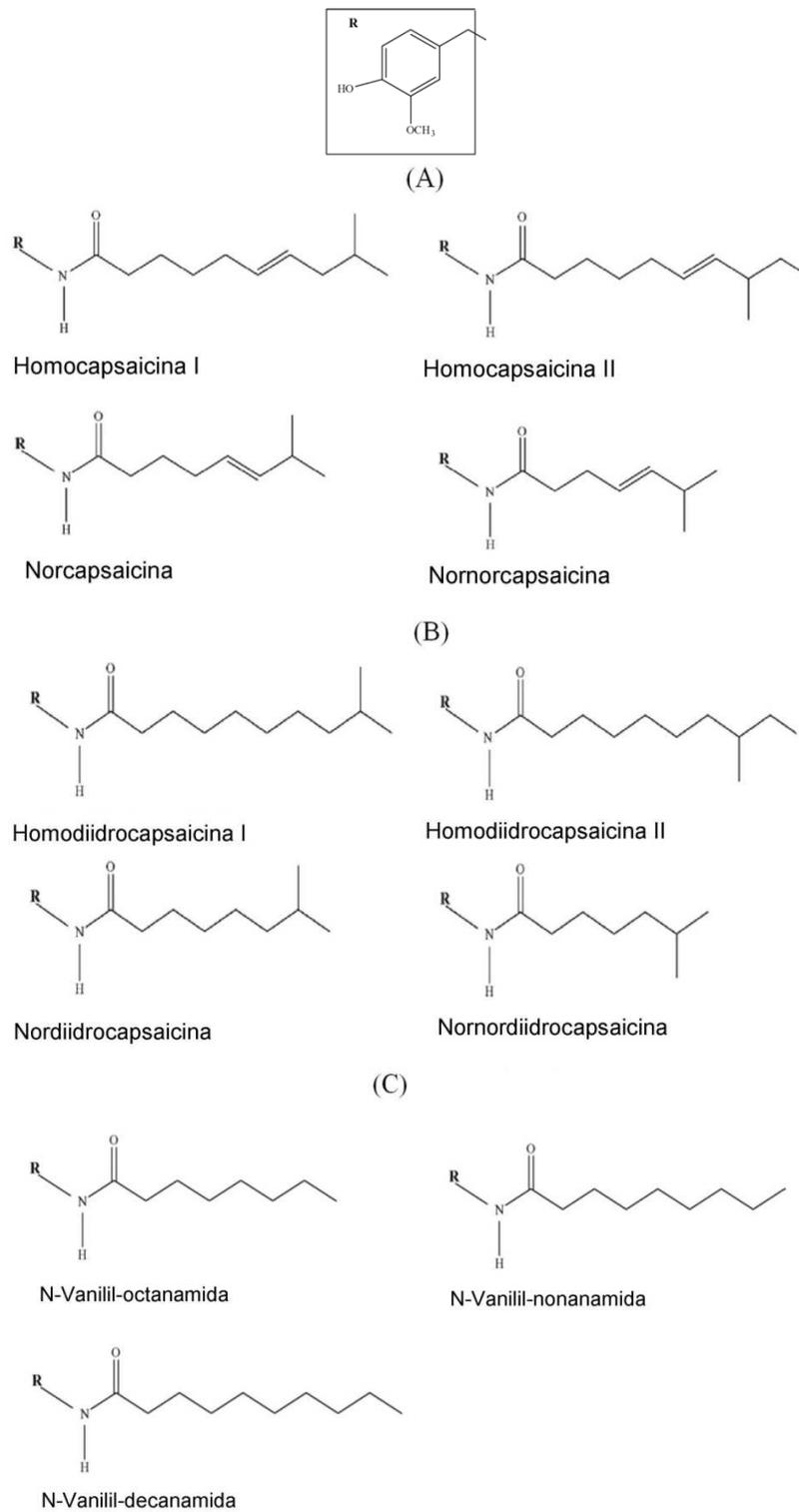


Figura 2. Principais análogos dos capsaicinóides: (A) capsaicina, (B) dihidrocapsaicina e (C) nordihidrocapsaicina. Adptado de Schweiggert et al. ¹⁸

Considerando que os frutos são o resultado da evolução das espécies vegetais, para dispersão de sementes pela atração de animais que as consomem e, posteriormente, as espalham em outros locais através do trato gastrointestinal, pode parecer paradoxal que uma dada espécie produza frutos extremamente atrativos e dispenda complexas rotas bioquímicas para síntese de substâncias que funcionam como barreira à dispersão. No entanto, esta é na verdade uma vantagem evolutiva, pois a permanência das sementes de *Capsicum* sob as condições existentes ao longo do trato intestinal de mamíferos impediria a sua germinação. Porém, acredita-se que a sensação de “queimação” percebida nas mucosas de mamíferos inexistia para as aves, de modo que estas são as principais responsáveis pela disseminação de suas sementes na natureza, e muitas vezes um problema em plantações de pimentas.¹⁹

A sensação de pungência provocada pelos capsaicinóides é percebida pelos mamíferos como o resultado da interação destas substâncias com os receptores nervosos de calor e dor da pele e mucosas que desencadeiam vários processos fisiológicos, entre os quais, o mais evidente é o de que a pele ou mucosas estão “queimando”.²⁰ Considerando tal informação cabe indagar a razão pela qual certas pessoas buscam a sensação de calor, irritação, formigamento e dor provocadas pelos capsaicinóides em um alimento. Acredita-se que, além das preferências pessoais pelo “picante dentro do suportável”, quando o sistema nervoso recebe informações de que alguma parte do corpo está queimando, ele libera uma série de endorfinas, no intuito de aliviar a dor provocada pela queimadura, estas por sua vez proporcionam uma sensação de bem estar que normalmente é descrita pelos adeptos do consumo de produtos picantes.³ Além

disso, os capsaicinóides possuem diversas outras aplicações como ação antimutagênica, antitumoral, antioxidante, como analgésico tópico para tratamento de dor severa em neuralgia pós-herpética e na indústria bélica na fabricação de armas não letais como é o caso dos sprays de pimenta²¹⁻²⁶.

1.1.1. Análise química de Capsaicinóides

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas e aplicadas para identificar e quantificar capsaicinóides. Em 1912, o químico Wilbur Scoville, realizou uma série de diluições de pimentas em água até que a pungência destas não fosse mais percebida quando avaliada por grupo de pessoas que experimentava estas diluições. O número de diluições necessárias para não se perceber a pungência foi o valor adotado por Scoville para construir a escala de pungência. Por exemplo, uma dada amostra com valor 100.000 indica que foi necessário diluir cem mil vezes a amostra para não se perceber sua pungência.²⁷ Assim, quanto maior o número de diluições maior a pungência da pimenta. Embora simples, este método é considerado subjetivo, e apresenta a desvantagem de não permitir a determinação individual dos diferentes capsaicinóides. Além da escala Scoville, outros métodos instrumentais como a espectrofotometria, espectrometria de massas (MS, “*Mass Spectrometry*”), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, “*High Performance Liquid Chromatography*”) e cromatografia gasosa (GC, “*Gas Chromatography*”) têm sido utilizados para quantificar capsaicinóides em pimentas.

Pino et al.²⁸, realizando leitura espectrofotométrica a 280 nm e curva calibração de capsaicina, determinaram e quantificaram capsaicinóides totais em

pimentas do tipo Habanero provenientes do México em diferentes estádios de maturação, encontrando teores de 42,6 mg.g⁻¹ e 50,5 mg.g⁻¹ de peso seco de pimenta, nos estádios imaturo e maduro, respectivamente.

Thomas et al.²⁹ desenvolveram um método de análise de capsaicinóides por GC utilizando detector termiônico seletivo (TSD, “*Thermionic Selective Detector*”) utilizando extração sólido-líquido com acetona, para quantificar oito diferentes capsaicinóides em diversos tipos de pimentas, e encontraram níveis de 89 a 14.000 µg.g⁻¹ de capsaicinas e 14 a 750 µg.g⁻¹ de diidrocapsaicinas nas amostras analisadas. Já Peña-Alvarez et al.³⁰ utilizaram microextração em fase sólida (SPME, “*Solid Phase Microextraction*”) e GC/MS para analisar capsaicinóides em onze variedades de pimentas e quatro variedades de molhos de pimentas encontrando dessa forma teores de capsaicina na ordem de 55 a 25.459 µg.g⁻¹ e diidrocapsaicinas na ordem de 93 a 1.130 µg.g⁻¹ em pimentas, enquanto que em molho de pimenta os valores foram de 4,3 a 7.173 e 1 a 134,8 µg.g⁻¹, respectivamente.

Singh et al.³¹ utilizaram HPLC para quantificar capsinóides (análogos não pungentes, resultantes da substituição do N-H por oxigênio na molécula dos capsaicinóides) em diversas espécies de *Capsicum* provenientes dos EUA. Neste trabalho, os analitos foram extraídos com acetonitrila; o extrato obtido foi filtrado e submetido à separação cromatográfica em uma coluna C₁₈, utilizando fase móvel acetonitrila e água (60:40) à 1 mL.min⁻¹ e detector de arranjo de diodos (DAD); os referidos autores encontraram concentrações de 11 a 369 e 18 a 86 µg.g⁻¹ para o E-capsiate e diidrocapsiate, respectivamente. Kozukue et al.³² desenvolveram e aplicaram um método para quantificação de oito capsaicinóides em diferentes

partes dos frutos de *Capsicum*, utilizando HPLC/MS, extração com metanol, coluna C₁₈, e gradiente acetonitrila-água acidificada com ácido fórmico, sob fluxo de 1 mL.min⁻¹; encontrando assim capsaicinóides em níveis de 0,5 a 3.600 µg.g⁻¹ de pimenta fresca. Enquanto que Garcercéres-Clavier et al.³³ desenvolveram metodologia por HPLC acoplado a fonte de ionização por eletrospray (ESI) e detector de massas por tempo de voo (TOF/MS, “*Time of Flight Mass Spectrometry*”) para determinar capsaicina e diidrocapsaicina em diferentes genótipos de *Capsicum*, utilizando acetonitrila para extração, coluna C₁₈ para separação cromatográfica sob gradiente de metanol água; encontrando valores de 8,7 a 6.639 e 2,3 a 3.727 mg.Kg⁻¹ de peso seco para capsaicina e diidrocapsaicina, respectivamente.

Além dos trabalhos citados, a literatura é vasta em metodologias analíticas, principalmente focadas em HPLC-DAD ou HPLC/MS para análise de capsaicinóides em pimentas e ou produtos que os contenham. Isso demonstra que este é um assunto de constante interesse para pesquisadores, seja visando identificar e quantificar estes compostos como parâmetro de qualidade ou investigar novos análogos de capsaicinóides nas mais diversas amostras.

1.2. Compostos voláteis em pimentas

1.2.1. Funções biológicas dos compostos voláteis

Diferente do gosto, atribuído a componentes não voláteis presentes nos alimentos tais como açúcares, alcalóides, sais e ácidos (doce, amargo, salgado e azedo, respectivamente), as substâncias de aroma compreendem misturas complexas de dezenas ou centenas de compostos voláteis sintetizados,

acumulados e emitidos pelos tecidos ou células de determinado alimento. Estes compostos estão relacionados à combinação do sabor e do odor dos alimentos, ou em outras palavras, com seu *flavor*.³⁴

Os voláteis associados ao *flavor*, geralmente são derivados de ácidos graxos, aminoácidos ou carboidratos. Estes compostos de baixo peso molecular apresentam uma variedade de grupos heterogêneos de moléculas com cadeias saturadas, insaturadas, lineares, ramificadas ou cíclicas que podem conter grupos funcionais como alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres, além de heteroátomos como enxofre e nitrogênio. Tais compostos possuem importância comercial para a indústria de flavorizantes, farmacêutica, de alimentos e para a agricultura.

Embora abundantes em plantas, muitos produtos naturais têm sido alvo da síntese química de suas moléculas a fim de se obter análogos de baixo custo e com uniformidade de produção (não sujeitos a variações de clima, cultivo e práticas agrícolas). Devido a tal interesse, muitas pesquisas têm sido direcionadas para a caracterização de voláteis nas mais diversas matérias primas, a fim de compreender sua participação nos atributos sensoriais de diversos produtos. No caso de alimentos, os compostos voláteis têm sido relacionados ao *flavor* como parâmetro de avaliação da qualidade de produtos de origem vegetal. Além disso, avanços significativos têm sido obtidos na compreensão da genética e bioengenharia de sua formação, o que contribui para a descoberta de novas formas de síntese química e/ou aplicações em bioprocessos para obtenção destas substâncias.⁴⁴

As espécies vegetais, em todas as suas partes, como folhas, flores, frutos e raízes, produzem compostos voláteis que desempenham múltiplas funções, não

apenas relacionadas à sua volatilidade, mas também à interações ecológicas específicas entre linhagens distintas ou de mecanismos de defesa restritivo a certas espécies, conferindo fortes características adaptativas na seleção ambiental para a sobrevivência das plantas.³⁵

Compostos voláteis sintetizados pelas flores estão mais relacionados com a atração de polinizadores, e em alguns casos com a capacidade de atrair polinizadores específicos.³⁶ Além desta função, voláteis presentes em flores possuem a capacidade de proteger os carboidratos existentes no néctar por inibição do crescimento de microrganismos, também protegem os órgãos reprodutivos das plantas do ataque de herbívoros de forma direta ou indireta, atraindo artrópodes que parasitam estes herbívoros, minimizando assim possíveis danos.^{37, 38} Os compostos voláteis atuam também estabilizando as membranas dos tilacóides aumentando a tolerância à fotossíntese em altas temperaturas ou ainda extinguindo espécies reativas do oxigênio.³⁶

Nos frutos, a acumulação e a liberação de voláteis estão, provavelmente, envolvidas com os processos de facilitação da dispersão de sementes por animais e insetos, hipótese reforçada pela inexistência de muitas destas substâncias em frutos imaturos ou em outras partes do vegetal. Ademais, certos voláteis são formados apenas quando ocorre alguma lesão nos tecidos dos frutos e muitas vezes, apresentam ação antimicrobiana e antitumoral.³⁹ Os voláteis dos frutos possuem impacto econômico, pois são um dos parâmetros de qualidade e preferência para o consumidor.

No caso de pimentas *Capsicum*, diversos trabalhos na literatura relatam a pesquisa de seus componentes voláteis revelando uma composição química

complexa com mais de uma centena de constituintes identificados.^{9, 28, 40} A grande diversidade de compostos e de grupos químicos entre os voláteis de *Capsicum* são um indicativo da sua importância para os fatores anteriormente descritos de adaptabilidade, dispersão de sementes e proteção.

1.2.2. Rotas biossintéticas de voláteis

De modo geral, os voláteis são produzidos pelos tecidos vegetais em estruturas anatômicas especializadas capazes de expressar enzimas envolvidas com a transformação de produtos do metabolismo primário em compostos voláteis.^{41, 42, 43} Na Figura 3, podem ser observadas algumas das principais rotas de formação de compostos voláteis a partir de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos.

1.2.2.1. Compostos voláteis derivados de carboidratos

Furanonas e piranonas são importantes constituintes de frutos e outros tecidos vegetais dentre estes, a 4-hidroxi-3(2H)-furanona e o maltol constituem um grupo de moléculas com baixíssimo limiar de percepção de odor (“*threshold*”).⁴⁴ Embora hexoses e pentoses sejam produtos primários da fotossíntese, um limitado número de voláteis se origina natural e diretamente da degradação de seus esqueletos carbonados.⁴⁵ Furanonas são usualmente emitidas apenas pelos frutos, e compostos como o furaneol estão relacionados à atração de animais para dispersão de sementes. Em pimentas, já foram identificados compostos como 2-etilfurano (pungente, ácido, doce) e 2-pentilfurano (amanteigado e verde), provavelmente relacionados às funções acima descritas.^{40, 47}

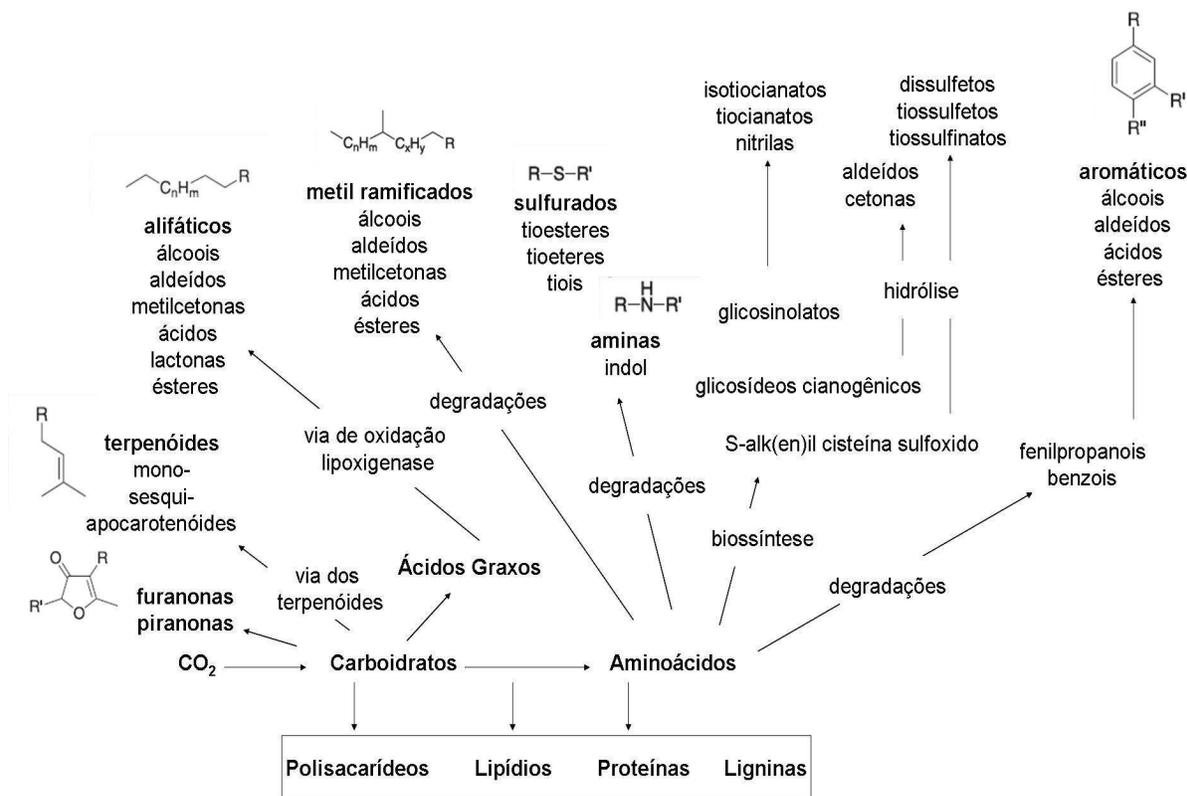


Figura 3. Rotas de formação de compostos voláteis a partir de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos. Adaptado de Schwab et al.³⁷

Terpenóides são constituintes de uma das mais diversas famílias de produtos naturais com mais de 40.000 diferentes estruturas identificadas.³⁷ Hemiterpenóides (C_5), monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}) e diterpenóides (C_{20}) estão envolvidos em interações entre plantas e insetos herbívoros ou polinizadores e são associados à defesa geral ou resposta ao stress.^{36, 46} Terpenóides são enzimaticamente sintetizados a partir do acetil CoA e piruvato provenientes de carboidratos nos plastídios e no citoplasma das células. Embora a oxidação de ácidos graxos também contribua para a formação de acetil CoA, esta via não contribui com a formação de terpenóides. Basicamente eles derivam de unidades de isoprenil difosfato e seu isômero dimetilalildifosfato,

sintetizados por duas vias paralelas o mevalonato no citosol e o metileritriol-4-fosfato nos plastídios.^{42, 48, 49, 50} Além disso, reações de degradação de tetraprenóides como, por exemplo, os carotenóides, dão origem a compostos potentes de *flavor* que possuem baixo *threshold* ($0,007\text{nL.L}^{-1}$) como a β -ionona que pode ser obtida pela degradação do β -caroteno.⁴⁴ A Figura 4 ilustra a formação de diferentes famílias de terpenos dos precursores universais isopentilfosfato e dimetilalil difosfato.

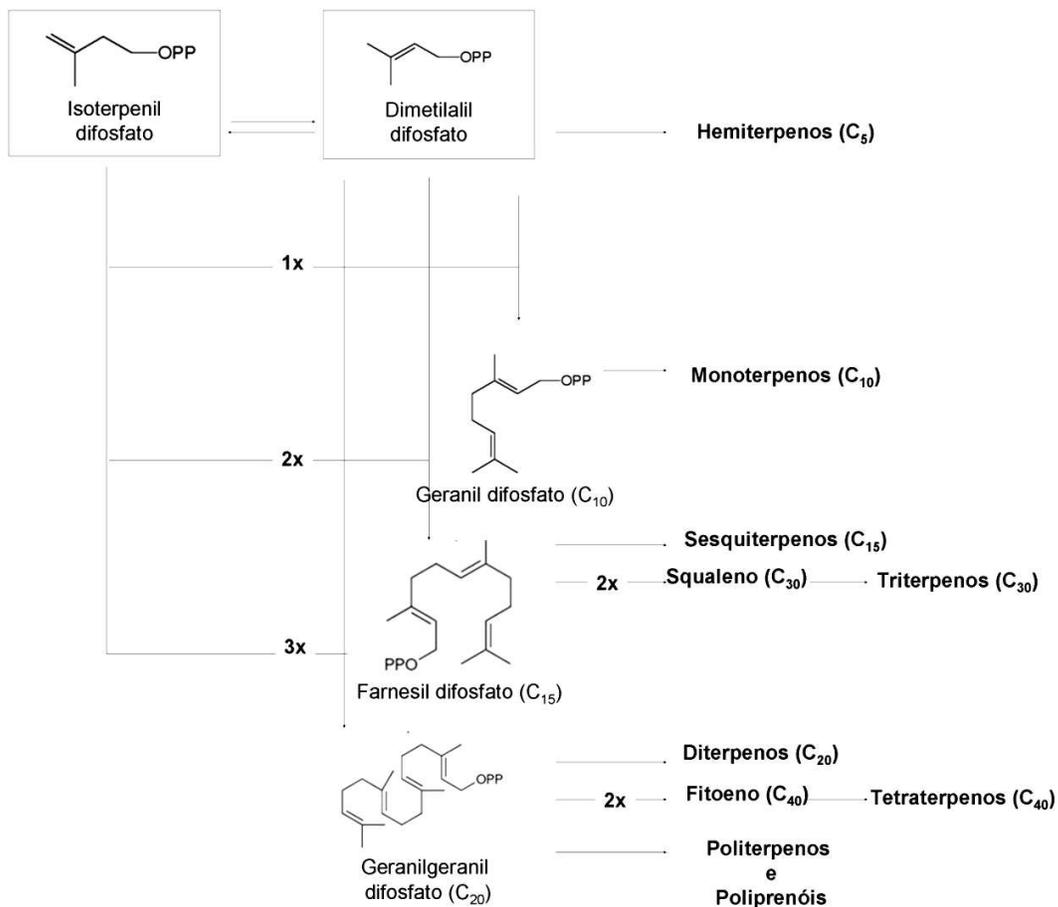


Figura 4. Formação de diferentes famílias de terpenos dos precursores isopentilfosfato e dimetilalil difosfato. Adaptado de Reineccius.⁵²

Em pimentas *Capsicum*, são comumente encontrados na classe de voláteis, monoterpenos e sesquiterpenos, com destaque para aqueles oxigenados, que freqüentemente possuem notas florais ou frutais (β -ciclocitral, cubenol, α -ionona β -ionona linalool, α -cadinol e (Z)-nerolidol).^{9, 28, 40, 51}

1.2.2.2. Derivados de ácidos graxos e outros voláteis lipofílicos.

Voláteis lineares derivados de ácidos graxos possuem a enzima lipoxigenase (LOX) ou então a α ou a β -oxidação envolvidos nos seus processos de biossíntese. Aldeídos e alcoóis de C₆ a C₉ são importantes para o *flavor* de frutos e vegetais, e são normalmente utilizados como aditivos na indústria de alimentos, devido ao seu odor com notas de “verde fresco”. A LOX é uma dioxigenase, não-heme, que contém ferro na sua estrutura e que catalisa reações de ácidos graxos insaturados como o alfa-linolenico (18:3n-3) e linoléico (18:2n-6), em hidroperóxidos e finalmente em flavorizantes como (Z)-3-hexenol, (E)-2-hexenal e (E)-2,(Z)-6-nonadienal. Destaca-se que os aldeídos presentes nos voláteis de uma amostra afetam mais o aroma se comparados aos alcoóis, devido principalmente ao menor *threshold* que apresentam quando comparados a estes. A Figura 5 ilustra os principais processos de formação de ésteres de cadeia linear a partir dos ácidos graxos alfa-linolenico, linoleico, oleico e esteárico através da lipoxigenase (LOX) e β -oxidação.

Pimentas *Capsicum* apresentam diversos alcoóis e aldeídos na sua composição de voláteis, com destaque para os alcoóis 1-hexanol (frutal, verde, herbáceo), (Z)-3-hexenol (gramíneo, verde fresco), (E)-2-hexenol (amêndoa, frutal, especiaria), 1-octen-3-ol- (herbáceo, cogumelo); e para os aldeídos: (Z)-3-hexenal

(gordura, verde, frutal), (E)-2-hexenal (frutal, amendoado, especiaria doce), (E)-2-octenal (amêndoa, doce, herbáceo) e hexanal (verde, gramíneo, frutado, pimenta).

9, 28, 40, 51

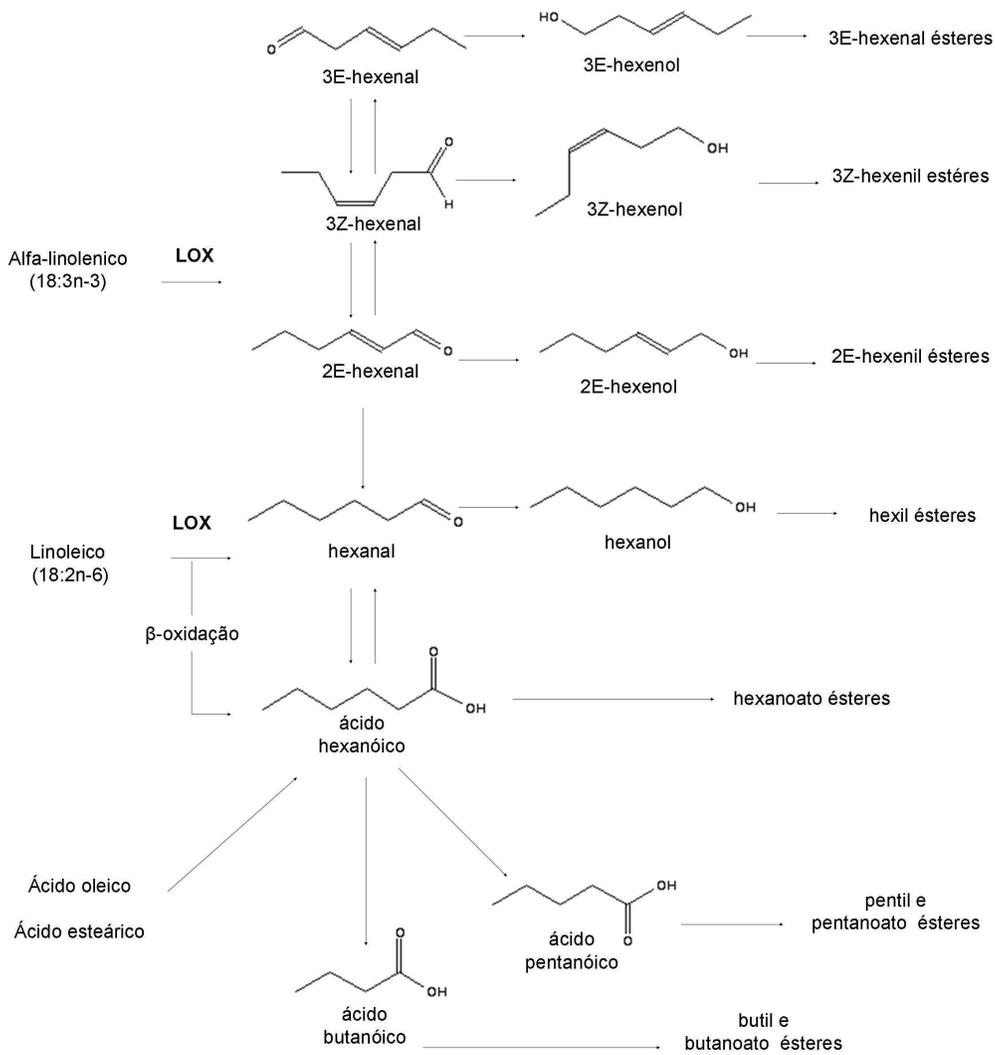


Figura 5. Formação de ésteres de cadeia linear a partir dos ácidos graxos alfa-linolênico, linoleico, oleico e esteárico através da lipoxigenase (LOX) e β-oxidação. Adaptado de Reineccius.⁵²

1.2.2.3. Compostos voláteis derivados de aminoácidos

O metabolismo de aminoácidos também gera uma grande variedade de compostos voláteis como, por exemplo, compostos aromáticos, alifáticos e uma série de compostos de cadeia ramificada com grupos funcionais de alcoóis, ácidos, ésteres e carbonilados. Valina, leucina, alanina e ácido aspártico podem ser convertidos em voláteis carbonilados de cadeia curta, como o 2-metilpropil e 3-metilbutil ésteres. Enquanto que a isoleucina pode participar da formação de 2-metilbutil e 2-metilbutenil ésteres.⁴⁴

As pirazinas, compostos de baixíssimo *threshold* (0,001 a 0,002 nL.L⁻¹) e de conhecida importância para diversas variedades de pimentões, também podem ser formadas por reações de degradação de aminoácidos como a leucina.⁵¹ Em *Capsicum* já foram identificados voláteis ramificados como 2-metil-butenal (chocolate, verde, malte), 2-metilbutil isobutanoato (frutal), 2-metilpropanal (verde, pungente, tostado) e 6-metil-5-hepten-2-ona (frutal, cogumelo).^{9, 28, 40, 51}

1.2.2.4. Compostos de impacto para o flavor

Apesar de existirem diversos compostos voláteis em uma dada amostra, nem todos possuem correlação direta com a percepção de seu *flavor*. Acredita-se que apenas 5% dos voláteis de um alimento tipicamente contribuem para a percepção do seu aroma.⁵³ Ademais, a combinação de proporções específicas da mistura de diversos voláteis, influenciados por condições de grau de maturação, variedade e técnicas de processamento, é que irão conferir o *flavor* característico de um alimento.⁵⁴ Como exemplo, pode-se citar o n-hexanal, que é um composto do *flavor* natural de maçã; entretanto, quando avaliado sensorialmente de forma

isolada, seu odor lembra notas de “verde, tinta, e ranço”, que nada tem em comum com o *flavor* de maçã. Deve-se considerar também que alguns alimentos possuem os chamados compostos de impacto, ou seja, compostos que mesmo quando isolados, são capazes de produzir as principais sensações sensoriais de identidade de um alimento. Como exemplo pode-se citar o etil-2-metil butirato, (Z,Z)-3,6-nonadienol e o acetato de isoamila que são compostos de impacto da maçã, melão e da banana, respectivamente. Os alimentos que possuem compostos de impacto têm grande valor industrial, pois através da sua síntese química, pode-se obter aromas artificiais que conseguem assemelhar-se com bastante proximidade do *flavor* natural do alimento.⁴⁵ Na presente revisão bibliográfica, não foram encontrados relatos de compostos de impacto em pimentas *Capsicum*, provavelmente devido à complexidade em quantidade e diferentes proporções dos voláteis presentes. Entretanto, alguns trabalhos relataram a presença de 2-isobutil-3-metoxipirazina, hexanal, (E)-2-hexenal, linalool, 2,3-butanediona e 3-careno como compostos presentes em diversos tipos de pimentas.^{40, 51, 55, 56}

1.2.3. Caracterização química de voláteis em *Capsicum*

O trabalho analítico de caracterizar a fração volátil de algum alimento basicamente pode ser resumido nas etapas de isolamento dos compostos voláteis, sua separação cromatográfica e posterior identificação e quantificação.

Na etapa de extração do aroma de alimentos, critérios físicos (solubilidade e cinética de partição) e químicos (pH, influência e composição da matriz do alimento) devem ser cuidadosamente considerados para escolha das diferentes

metodologias aplicáveis ao tipo de amostra em questão. Em suma, existem duas abordagens para o isolamento de compostos voláteis: a análise total (extração dos voláteis presentes na amostra propriamente dita), e a análise dos voláteis presentes na fase gasosa em equilíbrio com a amostra (do inglês “*headspace*”). A análise total baseia-se na capacidade dos voláteis separarem-se de uma amostra através de alguma forma de destilação (a pressão atmosférica ou reduzida), ou por arraste de vapor. Como este tipo de análise envolve calor e posterior aplicação de solventes para concentrar os compostos extraídos, perdas ou modificações significativas pela formação de artefatos podem ocorrer facilmente. Aparatos como hidrodestilador tipo Clevenger ou de destilação e extração simultâneas (SDE, “*simultaneous steam-distillation-solvent*”) do tipo Likens-Nickerson são exemplos de análise total. Já a análise por *headspace* fundamenta-se na caracterização dos voláteis da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra, em um sistema fechado a uma determinada temperatura. Exemplos do emprego desta técnica são o trapeamento sob vácuo do *headspace* (com o uso de uma armadilha recheada com materiais adsorventes que coletam e concentram os voláteis, para posterior eluição com solventes orgânicos) e o uso de técnicas sortivas como a microextração em fase sólida de *headspace*.⁵⁷

Quanto à separação dos voláteis extraídos, normalmente são utilizadas técnicas cromatográficas como a GC acoplada a detectores de ionização em chama (FID, “*Flame Ionization detector*”), MS, ou detecção olfatométrica (GC-O). Esta última abrange desde a simples identificação sensorial dos compostos separados (*Sniffing*) a métodos dedicados a encontrar a diluição do *threshold* de

cada composto (AEDA e CHARM) ou mesmo a avaliação por tempo intensidade dos voláteis (OSME).⁵⁸

Quanto à investigação de voláteis em *Capsicum*, diversos métodos analíticos têm sido empregados, com diferentes objetivos, que vão desde a caracterização desta fração, à proposição de novas metodologias de análise e avaliação da qualidade de matérias primas. Wu et al.⁵⁹ utilizaram SDE e GC/MS, para investigar os efeitos de danos no tecido de pimentões sobre seus constituintes voláteis. Tais autores identificaram 27 compostos e verificaram que (Z)-3-hexenol, (E)-2-hexenal, hexenol, (E)-2-hexen-1-ol e hexanal podem ser formados após danos nos tecidos dos frutos, provavelmente como resultado da ação enzimática sobre ácidos graxos insaturados. Luning et al.⁴⁰ investigaram os compostos voláteis presentes em pimentões frescos em diferentes estágios de maturação utilizando *headspace* dinâmico equipado com uma armadilha de Tenax TA como sorbente, GC/MS para separação e identificação, além de *sniffing* para descrever sensorialmente os voláteis nas amostras. Estes autores identificaram 64 compostos voláteis em proporções que variaram conforme o grau de maturação dos pimentões, verificando ainda que compostos como 2,3-butanediona (caramelo), 1-penten-3-ona (pungente, especiaria), hexanal (gramíneo), 3-careno (pimentão vermelho), (Z)-beta-ocimeno (ranço, doce), octanal (frutal), e 2-isobutil-3-metoxirazina (pimentão verde) eram comuns aos diferentes estágios de maturação, e que durante o amadurecimento a maior parte dos voláteis com notas de verde diminuíram ou desapareceram, a exceção do (E)-2-hexenal (amendoado, frutal) e o (E)-2-hexenol (verde), que aumentaram com a maturação.

Guadayol et al.⁵⁹ compararam cinco métodos de extração: SDE (Likens-Nickerson) a pressão atmosférica e a baixa pressão (160 mmHG), trapeamento com armadilha, *headspace* estático e dinâmico, na análise por GC/MS de oleoresina de páprica (*Capsicum frutescense*). Dessa forma, identificaram um total de 44 voláteis, e verificaram que a SDE a baixa pressão foi o método que extraiu o maior número de voláteis, seguido da mesma técnica a pressão atmosférica, trapeamento, *headspace* dinâmico e estático. van Ruth et al.⁶⁰ compararam os métodos cromatográficos de GC-FID, GC/MS e GC-O além de métodos diretos de MS na investigação do aroma de pimentão reidratado identificando assim, 63 compostos voláteis por GC/MS. Os autores verificaram que 11 possuíam poder odorífero, sendo que o 3-metilbutanal e o 2-metilbutanal foram os compostos de odor mais intenso.

Pino et al.^{9, 28} investigaram a fração volátil de diversas cultivares de *Capsicum chinense* c.v. Habanero, provenientes do México, em diferentes estádios de maturação, utilizando SDE (Likens-Nickerson) e GC/MS e identificaram 102 compostos voláteis predominantemente ésteres que possuem descritores sensoriais de notas frutais. Enquanto que Forero et al.⁴⁷ utilizando as mesmas técnicas analíticas, identificaram 140 compostos voláteis em *Capsicum annum* L. va. *glabriusculum*, proveniente da Colômbia.

Souza et al.⁶¹ aplicaram otimização multivariada para extração de voláteis por SPME e GC/MS em três tipos de pimentas frescas da variedade *Capsicum chinense* (amarela, vermelha e púrpura) e identificaram 34 compostos voláteis que permitiram a discriminação dos três tipos de pimentas por análise de componente principal (PCA). Enquanto que Cardeal et al.⁶² utilizaram SPME e cromatografia

gasosa bidimensional abrangente (GC x GC) para investigar os voláteis em diversos tipos de pimentas, entre elas uma variedade de *Capsicum frutescens* (pimenta caiena) proveniente da Guiana Francesa e identificaram para esta amostra 41 compostos voláteis, sendo a maioria deles terpenos.

Os compostos voláteis produzidos por frutos de *Capsicum* possuem complexas rotas metabólicas de formação que são influenciadas por fatores como genética das plantas, nutrição, tipo de solo, práticas agrícolas, estádios de maturação, fatores pós-colheita e processamento. Estes fatores podem interferir no tipo e na qualidade dos voláteis durante as etapas de formação e amadurecimento dos frutos e, uma vez que, muitos destes voláteis apresentam relação com o *flavor* das diferentes variedades de pimentas existentes, podem estar relacionados à qualidade das mesmas. Assim, estudos da composição química dos voláteis, e da relação destes com o *flavor* de pimentas, através de métodos analíticos apropriados, constituem um contínuo e crescente campo de pesquisa a ser explorado, a fim de se buscar indicadores para a melhoria da qualidade de pimentas.

1.3. Capacidade antioxidante de *Capsicum*

*1.3.1. Estresse oxidativo e propriedades antioxidantes de pimentas *Capsicum**

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, enxofre, cloro, carbono, complexos de metais de transição (Fe, Cu, Mn e Cr) e a remoção destes pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante é comumente definido como estresse oxidativo. Estas espécies reativas incluem não só os radicais ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, NO^{\cdot}), mas também intermediários

neutros ou carregados (H_2O_2 , ONOO^-) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ($^1\text{O}_2^*$, O_3 , Fe, Cu).^{63, 64, 65} Ademais, íons metálicos sem atividade redox direta, como os cátions de metais pesados (Pb, Cd) e trivalentes (Bi, Al), podem se ligar fortemente aos grupos fosfatos dos fosfolipídios de membranas celulares, diminuindo sua fluidez e aumentando sua peroxidabilidade.⁶³ As consequências do estresse oxidativo estão associadas aos processos de envelhecimento e patologias degenerativas como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares e danos ao DNA, como mutagênese e carcinogênese.^{64, 65, 66, 67, 68}

Assim, o mercado de alimentos tem se mostrado ávido por produtos considerados funcionais, ou seja, alimentos que contêm em sua composição alguma substância biologicamente ativa que pode desencadear processos metabólicos ou fisiológicos para a redução do risco de doenças e na manutenção da saúde.⁶⁹ Estas substâncias, quando capazes de inibir os processos oxidativos biológicos, são denominadas de antioxidantes e muitas delas estão naturalmente presentes em várias espécies vegetais.

Dentre os diversos antioxidantes presentes em um alimento destacam-se os compostos fenólicos. Estes possuem entre outras funções a capacidade de complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e a modulação de vias sinalizadoras celulares.⁷⁰ Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Derivam do metabolismo secundário, mais especificamente da via do

ácido chiquimico e do metabolismo dos fenilpropanóides.⁷¹ Nas plantas são essenciais para o crescimento e reprodução, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação. Estima-se que existam mais de cinco mil fenólicos descritos na literatura, e entre estes, destacam-se como antioxidantes os flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis.^{72, 73}

Os ácidos fenólicos são compostos que possuem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila ou metoxila na molécula (responsáveis pela ação antioxidante). Já os flavonóides, são constituídos de dois anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (anel C). Substituições nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides, e variações no anel C resultam em diferentes classes como flavonóis, flavonas, flavanóis, isoflavonas, antocianidinas, etc.

Diversos trabalhos na literatura atribuem a pimentas *Capsicum*, propriedades antioxidantes, principalmente por estas serem fontes de flavonóides e capsaicinóides, que são seus fenólicos predominantes. Entretanto, já foram relatadas a presença de pequenas quantidades de ácido protocatecuico, clorogênico, cumárico e ferrúlico em algumas variedades de *Capsicum*.⁷⁴ Na Figura 6 podem ser visualizados alguns dos principais fenólicos existentes em pimentas.

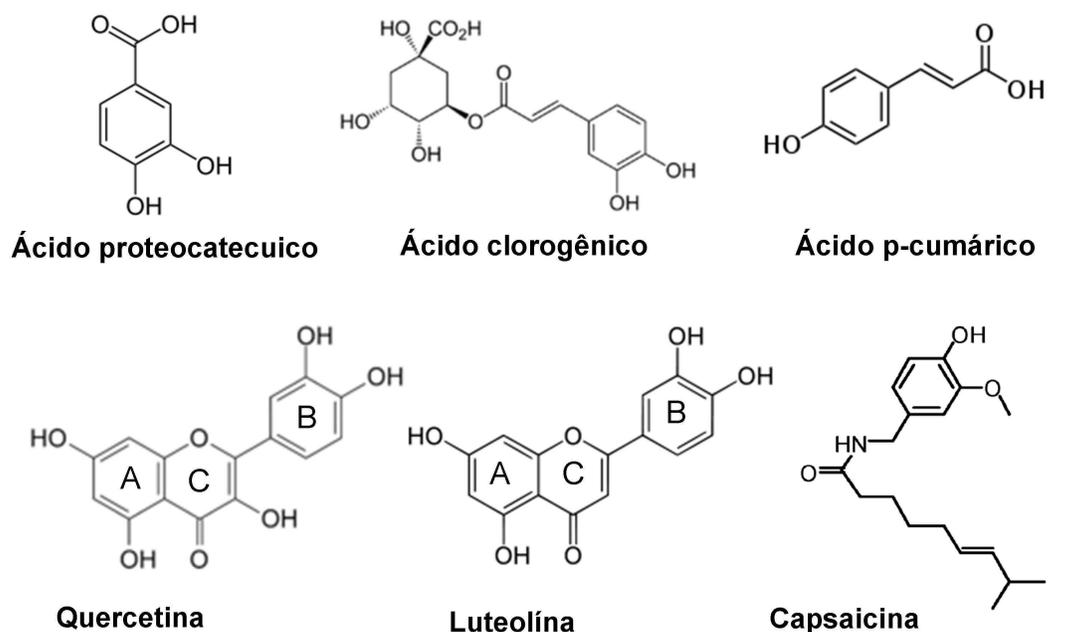


Figura 6. Principais compostos fenólicos em *Capsicum*: ácidos fenólicos (protocatecuico, clorogênico e p-cumárico), flavonóides (quercetina e luteolína) e capsaicina.

Os ácidos protocatecuico, clorogênico e cumárico, são alguns dos fenólicos mais relatados em frutos de pimentas.^{75, 76} Contudo, principalmente por se tratar de frutos, vários destes compostos encontram-se na forma glicosilada. Iorizzi et al.⁷⁷ identificaram a presença de ácido (Z)-p-cumárico-4-O-β-D-glucosídeo, ácido (E)-sináptico-β-D-glucosídeo e ácido vanílico-β-D-glucosídeo em pimentões. Matereska & Peruca⁷⁸ isolaram diversos ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados em 5 variedades de *Capsicum*, sendo que os encontrados em maiores quantidades foram glicosídeos dos ácidos sináptico e ferrúlico em frutos maduros, enquanto que, em frutos imaturos a quercetina-3-O-L-ramnosídeo foi o composto mais abundante.

O trabalho analítico de atribuir a um alimento ou a uma fração isolada de um produto natural (extrato) certa propriedade antioxidante é uma tarefa complexa. Etapas de preparo da amostra são fundamentais para se obter quantidades suficientes de compostos fenólicos para os posteriores testes de avaliação da capacidade antioxidante. O uso de diferentes solventes, como metanol, etanol, acetona, entre outros; em diferentes combinações ou proporções são amplamente descritos na literatura.⁷⁹

Além da extração, os diferentes métodos existentes para avaliar o poder antioxidante das amostras possuem fundamentos, mecanismos de ação e maneiras de expressar resultados de forma diferente, e por isso, devem ser cuidadosamente revisados antes de se escolher o método a ser aplicado. Esta escolha não deve ser feita apenas baseada na simplicidade ou no baixo custo da técnica analítica; mas também com base na expressão dos resultados para que seja possível a comparação destes, com outros trabalhos da literatura. Dentre os métodos aplicados para a avaliação do poder antioxidante em *Capsicum*, destacam-se: o teor de compostos fenólicos totais, e os métodos de seqüestro do radical livre DPPH* e de redução do ferro FRAP.

1.3.2. Compostos fenólicos totais

Dentre os diversos métodos analíticos para identificar e quantificar compostos com possível poder antioxidante em pimentas, talvez um dos mais simples e mais freqüentemente empregados é o de avaliação dos compostos fenólicos totais (CFT) pelo método de Folin-Ciocalteu. Tal método se fundamenta em mecanismos de oxidação/redução, mais especificamente na

capacidade que os compostos fenólicos possuem de reduzir, em meio alcalino, uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungústico, de cor amarela (forma oxidada), para complexos molibdênio-tungstênio de cor azul (forma reduzida).⁷⁹ O número de grupos hidroxilas ou de compostos potencialmente oxidáveis controla a intensidade da cor formada, que pode ser avaliada por espectrofotometria (620 a 740 nm).

Lee et al.⁸⁰ e Racchi et al.⁸¹ relatam um conteúdo de fenólicos totais em pimentões entre 1.180 a 3.849 mg.Kg⁻¹ de equivalente em ácido clorogênico em peso fresco. Estrada et al.⁸² verificaram que os teores destes diminuem com o amadurecimento, passando de 215 µg.Kg⁻¹ (14 dias após o florescimento) para 73 µg.Kg⁻¹ (42 dias após o florescimento). Enquanto que Chuah et al.⁸³ encontraram teores de 594 µmol de equivalente em ácido gálico.100 g⁻¹ de pimentões frescos; 458 e 444 µmol de equivalente em ácido gálico.100 g⁻¹ de páprica das variedades vermelha e laranja; e 369, 279 e 259 µmol de equivalente em ácido gálico.100 g⁻¹ de páprica amarela, páprica verde e pimenta verde, respectivamente.

Embora esta técnica seja relativamente simples e muito sensível, esta apresenta a desvantagem de não ser seletiva (o reativo de Folin-Ciocalteu pode se combinar com ácidos fenólicos, flavonóides, proteínas, açúcares, etc).⁷⁹ Portanto, recomenda-se que esta seja aplicada em etapas de pré-triagem, como um indicativo da presença e da quantidade de fenólicos na amostra para os métodos de avaliação antioxidantes a serem aplicados a posteriori.

1.3.3. Seqüestro do radical livre DPPH•

Quanto aos métodos dedicados a avaliar a capacidade antioxidante, o método do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), é um dos mais utilizados. Ele se fundamenta na capacidade que substâncias antioxidantes possuem de seqüestrar radicais livres, no caso o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazida (DPPH•), de cor púrpura. Este, ao ser reduzido por compostos fenólicos, adquire coloração amarela. Desta forma é possível medir a descoloração púrpura do radical livre DPPH• espectrofotometricamente (515 nm) e estimar o poder antioxidante de uma amostra.⁸⁴ Os resultados deste ensaio são normalmente expressos em equivalentes de algum antioxidante natural como o ácido gálico ou sintético como o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico); ou ainda através de percentagem de inibição do radical DPPH•, através de cálculos como o IC₅₀ ou do índice de ação antioxidante (IAA).⁸⁵ Guil-Gueerrero et al.⁸⁶ avaliaram a atividade antioxidante por DPPH• de extratos metanólicos de 10 variedades de pimentões e verificaram que tais extratos, nas concentrações por eles empregadas, possuíam atividade antioxidante comparável a alguns antioxidantes comerciais (BHA, BHT e Tocoferol). Chuah et al.⁸³ verificaram o efeito do cozimento nas propriedades antioxidantes de pimentões frente ao radical livre DPPH•. Estes autores utilizaram extração com uma mistura de metanol (90%) e ácido acético (0,5%) e verificaram níveis de 519 – 1.190 µM de equivalente trolox.100g⁻¹ de peso fresco; constataram também que estes níveis diminuía cerca de 66% após o cozimento dos pimentões por 30 minutos em água fervente. Sun et al.⁸⁷ verificaram a atividade antioxidante de páprica doce frente ao DPPH•, e encontraram valores de 2,1; 3,2; 3,5; e 3,9 µM de equivalente trolox.g⁻¹ de

produto fresco para as pimentas verde, amarela, laranja e vermelha. Os referidos autores também verificaram que estes foram capazes de inibir a oxidação do colesterol e do ácido docosahexanóico (22:6n-3) durante processos de aquecimento.

O método do radical livre DPPH• é considerado simples e rápido, e necessita apenas de um espectrofotômetro UV-vísivel para sua execução, o que provavelmente explica seu emprego em grande parte dos trabalhos de avaliação antioxidante. Entretanto, a interpretação dos resultados pode ser complicada quando os compostos testados possuem espectros que também absorvem próximo de 515 nm. Devido a isso, um critério prático e válido é verificar se os extratos a serem testados pelo método absorvem em torno deste comprimento de onda. Deve-se considerar o fato de o radical DPPH• ser capaz de perder cor não apenas por ação do antioxidante presente no ensaio, mas também por ação da luz, calor ou pela perda de estabilidade do próprio radical, bem como por reações não relacionadas ao efeito antioxidante.⁹² Talvez uma das maiores desvantagens do uso do radical livre DPPH• seja o impedimento estérico à sua molécula, por parte de antioxidantes de cadeia longa. Assim, moléculas pequenas possuem maior acesso ao radical, o que pode gerar controvérsia sobre a real maior ação antioxidante destas frente a outros antioxidantes com estruturas moleculares maiores.

1.3.4. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

O método FRAP foi desenvolvido para avaliações da capacidade antioxidante no plasma sanguíneo, mas logo foi adaptado para investigações

antioxidantes de produtos naturais. Este ensaio se fundamenta na capacidade que compostos antioxidantes possuem de transferir elétrons, mais especificamente, na capacidade que possuem de reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{+3} -TPTZ) para sua forma reduzida (Fe^{+2} -TPTZ), que pode então ser avaliado espectrofotometricamente (595 nm). Os resultados de FRAP são normalmente expressos em equivalente trolox ou de forma direta em mmol de Fe^{2+} .

Gorinstein et al.⁸⁸ realizaram um estudo comparativo da atividade antioxidante e antiproliferativa de fenólicos presentes em diversos vegetais, realizando extrações com metanol/água 50% com e sem 1,2M HCl. Tais autores encontraram, para pimentões verdes e vermelhos (*Capsicum annuum* L.), resultados de FRAP de 10,7 e 12,6 μM de equivalente trolox. g^{-1} de peso seco para amostras obtidas sem HCl e 16,25 e 18,8 μM de equivalente trolox. g^{-1} de peso seco quando a extração era realizada em presença do ácido. Ou et al.⁸⁹ pesquisaram a atividade antioxidante de diversos vegetais provenientes dos Estados Unidos, entre eles pimentas vermelha e verde, e encontraram por FRAP valores de 185 e 157 μM de equivalente trolox. g^{-1} de peso seco. Pellegrini et al.⁹⁰ investigando a capacidade antioxidante total de diversos vegetais, bebidas e óleos consumidos na Itália, utilizaram extração exaustiva com água seguida de acetona, e após clorofórmio, e encontraram valores de 23,54 e 20,98 mmol Fe^{+2} . Kg^{-1} de peso fresco em pimentas e pimentões, segundo e terceiro maiores valores antioxidantes entre os 34 vegetais por eles testados. Enquanto que Stangeland et al.⁹¹ utilizando extração com metanol sob ultrassom, encontraram valores de 2,91 e 0,38 mmol Fe^{+2} . g^{-1} de peso fresco em *Capsicum fruticosum* L e *Capsicum annuum* L, da Uganda.

A metodologia de FRAP é também simples, rápida e robusta, e assim como os outros métodos para avaliação do poder antioxidante abordados nesta revisão não requer equipamentos sofisticados.

2. CONCLUSÕES

É notória a grande diversidade genética de pimentas *Capsicum* existentes no Brasil, bem como sua importância econômica e relevância na aplicação em diversos setores industriais, contudo poucas variedades têm sido estudadas no que diz respeito à química dos seus componentes e a atividade biológica destes.

Os capsaicinóides são uma importante classe de alcalóides, presentes apenas em *Capsicum*, que possuem propriedades biológicas conhecidas, de importância para a qualidade sensorial das pimentas (pungência) e para a medicina (atividade antimutagênica, antitumoral, antioxidante e analgésica). Tais propriedades justificam a importância de pesquisas analíticas de identificação e quantificação destes em pimentas ou em produtos que os empreguem nas suas formulações.

Os voláteis produzidos por frutos de *Capsicum* possuem importância principalmente no que diz respeito à qualidade sensorial das pimentas e seus derivados alimentícios. Tais compostos possuem complexas rotas metabólicas de formação que são influenciadas por fatores como genética das plantas, nutrição, tipo de solo, práticas agrícolas, estádios de maturação, fatores pós-colheita e processamento. Assim, trabalhos de caracterização desta fração são importantes para o conhecimento e controle de reações químicas e/ou bioquímicas de impacto

na melhoria da qualidade, obtenção de aromatizantes ou controle de operações envolvidas no processamento destas especiarias.

A presença de compostos fenólicos nos mais variados tipos de *Capsicum* é um indicativo de que o consumo destas tenha alguma relação com a diminuição dos danos provocados pelo estresse oxidativo. E, ainda que não se disponha, no atual momento, de um único procedimento analítico que abranja os diferentes mecanismos de ação antioxidante, recomenda-se o uso de diferentes ensaios que possuam mecanismos químicos distintos para se estimar o poder antioxidante dos diferentes tipos de *Capsicum*.

Em suma, as diferentes espécies do gênero *Capsicum*, especialmente as produzidas no Brasil, apresentam boas perspectivas de estudo, principalmente quanto à química dos seus compostos bioativos.

3. REFERÊNCIAS

1. Reifschneider, F. J. B. (Org.) *Capsicum* - pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, **2000**.
2. EMBRAPA. Embrapa hortaliças. *Capsicum* pimentas e pimentões do Brasil. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.htm>, acesso em 28/12/2009.
3. Wagner, C.M. Tese de Doutorado: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, **2003**.
4. EMBRAPA. <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>. Acesso em: 28/12/2009.

5. EMBRAPA. II Encontro Nacional do Agronegócio Pimentas (*Capsicum* spp.) e II Mostra Nacional de Pimentas e Produtos Derivados. Brasília - DF. **2005**.
6. Steinhaus, M. & Schieberle, P. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, v.53, p. 6049-6055.
7. Neto, N.L. Dicionário Gastronômico Pimentas. Boccato Editores **2006** - SP.
8. Sousa, E.T.; Rodrigues, F.M.; Martinsa, C.C. de Oliveira; F.S., de P. Pereira, P. A.; and de Andrade J.B. *Microchem. J.* **2006**, 82, 142–149.
9. Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; Centurión-Yah, A. R.; Trujillo-Aguirred J.; Latournerie-Moreno, L.; and Sauri-Duch, E. *Food Chem.* **2007**,104, 1682-1686.
10. Bennett, D. J.; Kirby, G. W. *J. Chem. Soc.* **1968**, 442.
11. Suzuki, T.; Kawada, T. and Iwai, K. *Plant Cell Physiol.* **1981**, 22, 23-32.
12. Kosuge, S.; Furata, M. *Agric. Biol. Chem.* **1970**, 34, 248-256.
13. Iwai, K.; et al. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, 43, 2493-2498.
14. Kawada, T.; Watanabe, T.; Katsura, K.; Takami, H.; Iwai, K. *J. Chromatogr.* **1985**, 329, 99-105.
15. Govindarajan, V.S.; Rajalakshmi, D.; Chand, N. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1987**, 25, 185-283.
16. Garcés-Claver, A.; Arnedo-Andrés, M.S.; Abadía, J.; Gil-Ortega, R.; and Álvarez-Fernández, A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 9303-9311.
17. Bosland, P.W. Breeding for quality in *Capsicum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, **1993**, 12, 25-31.
18. Schweiggert, U.; Carle, R.; Schieber A. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 557, 236–244.
19. Melo, A. M. T. Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas. Pesquisadora Científica do Instituto Agronômico de Campinas, Brasil. Informe pessoal, **2003**.

20. Green, B.C. *Trends Food Sci. Technol.* **1996**, 71.
21. Surh, Y. J. *Carcinogenesis*, **1995**,16, 2467.
22. Toth, B., & Gannett, P. *In vivo*, **1992**, 6, 59.
23. Henderson, D. E., & Slickman, A. M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2563.
24. Murakami, K.; Ito, M.; Htay, H. H. Tsubouchi, R.; Yoshino, M. *Biomedical Research-Tokyo*, **2001**, 22, 15.
25. Morris, G. C., Gibson, S. J., & Helme, R. D. *Pain*, **1995**, 63, 93.
26. Reilly, C.A.; Crouch D.J.; Yosta, G.S. and Fatah, A. A. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 912, 259 –267.
27. Scoville, W. L. Note capsicum. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1912**, 1, 453.
28. Pino, J.; Sauri-Duchb, E. and Marbot, R. *Food Chem.* **2006**, 94, 394–398.
29. Thomas, B. V.; Schreiber, A. A. and Weisskopf C. P. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2655-2663.
30. Peña-Alvarez, A.; Ramírez-Maya, E. and Alvarado-Suárez, L. Á. *J. Chrom. A*, **2009**, 1216, 2843–2847.
31. Singh,S.; Jarret, R.; Russo V.; Majetich, G.; Shimkus, J.; Bushway R.; and Perkins B. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 3452-3457.
32. Kozukue, N.; Han J.S.; Kozukue, E.; Lee, S.J.; Kim, J.A.; Lee, K.R.; Levin C.E.; Friedman, M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9172-9181.
33. Garcés-Claver, A.; Gil-Ortega, R.; Álvarez-Fernández, A. and Arnedo-Andreás M.S. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6951-6957.
34. Thomson, D.M.H. *The meaning of flavour. In Developments in Food Flavours.* Birch, G.G. and Lindley, N.G., eds. Amsterdam: Elsevier, **1987**.
35. Pichersky, E. & Gershenzon, J. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, 5, 237–243.

36. Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol*, **2004**, 135, 1893–1902.
37. Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn E. *The Plant Journal*. **2008**, 54, 712–732.
38. Aharonia, A.; Girib, A. P. ; Verstappena, F.W.A.; Berteaa, C. M.; Seveniera, R.; Suna, Z.; Jongsmaa, M.A.; Schwabc, W.; and Bouwmeestera H.J. *Plant Cell*, **2004**.16, 3110–3131.
39. Goff, S.A. and Klee, H.J. *Science*, **2006**, 311, 815–819.
40. Luning, P.A.; de Rijk, T.; Wichers, H.J.; Roozen, J. P. J. *Agrlc. Food Chem*. **1994**, 42, 977-983.
41. BaGChi, G.D. *J. Med. Aromatic Plant Sci*. 2000, 2, 605–615.
42. Croteau, R. and Karp, F. Origin of natural odorants. *In Perfumes. Art, Science and Technology*. Muller, P.M. and Lamparsky, D., eds. London: *Elsevier Applied Science*, **1991**.
43. Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J.I.M., Mihaliak, C., Karp, F. and Croteau, R. *Anal. Biochem*. **1992**, 200, 130–138.
44. Schwab, W. and Roscher, R. *Recent Res. Dev. Phytochem*. **1997**, 1,643–673.
45. Bood, K.G. and Zabetakis, I. *J. Food Sci*. **2002**, 67, 2–8.
46. Pichersky, E., Noel, J.P. and Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, **2006**, 311, 808–811.
47. Forero, M. D.; Quijano, C.E.; Pino, J.A. *Flavour Fragr. J*. **2009**, 24, 25–30.
48. Lichtenthaler, H.K *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **1999**, 50, 47–65.
49. Rodriguez-Concepcion, M.; and Boronat, A. *Plant Physiol*. **2002**, 130, 1079–1089.

50. Rohmer, M. *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 375–388.
51. Kocsis, N.; Amtmann, M.; Mednyánszky, Z. and Korán, K. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2002**, 15, 195–203.
52. Reineccius G. *Flavor Chemistry and Technology.* 2nd ed. Taylor & Francis Group. New York. **2005**.
53. Grosch, W. *Chemical Senses*, **2001**, 26, 533–545.
54. Mc. Gorrin, R. Character Impact Compounds: Flavor and Off-Flavors in Foods. *In Flavor, Fragrance, and Odor Analysis.* Ray Marsili ed. New York, **2002**.
55. Chitwood, R. L.; Pangborn, R. M.; and Jennings, W. *Food Chem.* **1983**, 11, 201–216.
56. Mazida, M.M.; Salleh, M. M. and Osmanet, H. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2005**, 18 427–437.
57. Nongonierma, A.; Cayot P.; Le Queacutereacute, J.L.; Springett M.; Voilley, A. *Food Reviews International*, **2006**, 22, 51 – 94.
58. van Ruth, S.M. *Biomolecular Engineering.* **2001**, 17, 121–128.
59. Guadayol, J. M.; Caixach, J.; Ribé, J.; Cabañas, J. and RiveraGuadayol, J.; *J Agriculture Food Chem.* **1997**, 45, 1868–1872.
60. van Ruth, S.; Boscainib, E.; Mayr, D.; Pughc, J.; and Posthumus, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223–224, 55–65.
61. Sousa, E.T.; Rodrigues, F.M.; Martinsa, C.C.; de Oliveiraa, F.S.; Pereira, P.A.P.; and de Andrade, J.B. *Microchem. J.* **2006**, 82, 142–149.
62. Cardeal, Z. L.; Games da Silva, M.D.R.; Marriott, P.J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 2823–2836.

63. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, **2007**.
64. Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 1323.
65. Finkel, T.; Holbrook, N. J.; *Nature* **2000**, 408, 239.
64. Ames, B N.; Shigenaga, M K.; and Hagen, T M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***1993**, 90, 7915-7922.
65. Witzum, J.L. *Lancet.* **1994**, 12; 344(8933):1363-4.
66. Roy, P., & Kulkarni, A.P. *Food Chemical Toxicology.* **1996**, 34, 563-570.
67. Stahl, W., & Sies, H. *Diabetes, New York.* 1997, 46, 14-18.
68. Poulsen, H.E., Prieme, H., Loft, S. *European Journal of Cancer Prevention,* **1998**, 7, 9-16.
69. Anjo, D.F.C. *J Vasc Br.* **2004**, 3, 145-54.
70. Rahman, I.; Biswas, S.; Kode, A.; *Eur.J. Pharmacol.* **2006**, 533, 222.
71. Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. *Food Chem.***1999**, 66, 401-436.
72. Angelo PM & Jorge N. *Rev Inst Adolfo Lutz,* **2007**, 66,1-9.
73. Shahidi F & Naczk M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.* 2nd Ed. Lancaster: *Technomic*; **1995**.
74. Estrada, B., Bernal, M.A., Diaz, J., Pomar, F., and Merino, J. *Agric. Food Chem.,* **2000**, 48, 6234–6239.
75. Contreras-Padilla, M. and Yahia, E.M. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2075–2079.

77. Iorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Zollo, F., Blanco-Molina, M., Macho, A., and Munoz, E. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2022–2029.
78. Materska, M. & Perucka, I. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1750-1756.
79. Prior, R. L.; Wu, X. and Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290-4302.
80. Lee, Y., Howard, L.R., and Villalon, B. *J. Food Sci.* **1995**, 60, 473–476.
81. Racchi, M., Daglia, M., Lanni, C., Papetti, A., Govoni, S., and Gazzani, G. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1272–1277.
82. Estrada, B., Bernal, M.A., Diaz, J., Pomar, F., and Merino, F. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 6234–6239.
83. Chuah, A. M.; Lee, Y.C.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Yin, L.J.; Matoba, T. *Food Chemistry.* **2008**, 111, 20–28.
84. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; and Berset.; *C. Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, **1995**, 28, 25-30.
85. Scherer, R.; Godoy, H.T. *Food Chem.* **2009**, 112, 654-658.
86. Guil-Guerrero, J. L.; Martínez-Guirado, C.; del Mar, M.; Reboloso-Fuentes, A.; Carrique-Pérez. *Eur Food Res Technol*, **2006**, 224, 1–9.
87. Sun, T.; Xu, Z.; Wu, C.T.; Janes, M.; Prinyawiwatkul, W. and No, H. K. *J. Food Sci.* **2007**, 72.
88. Gorinstein, S.; Park, Y.S.; Heo, B.G.; Namiesnik, J.; Leontowicz H.; Leontowicz, M.; Ham K. S.; Cho J.Y.; Kang, S.G. *Eur Food Res Technol.* 2009, 228, 903–911.
89. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A. and Deemer, E.K.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3122-3128.

90. Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; and Brighenti, F. *J. Nutr.* **2003**, 133, 2812-2819.

91. Stangeland, T.; Siv, F.R.; Kåre .

92. Ozcelik, B.; Lee, J.H.; and Min, D.B.; *J. Food Sc.* **2003**, 68, 487-490.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE PIMENTAS CAPSICUM POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

Stanislau Bogusz Junior¹ & Helena Teixeira Godoy¹

Artigo segundo as normas de publicação 2009 da revista Química Nova.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6121, Campinas – SP, Brasil.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF EXTRACTION CONDITIONS OF VOLATILES COMPOUNDS OF BRAZILIAN CHILE PEPPER (*CAPSICUM SP.*) BY HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION: In order to investigate the volatile composition of *Capsicum chili* peppers, a headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) gas chromatography flame ionization detection (GC-FID) and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) method was developed and optimized. Five SPME fibers were tested for extraction: carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS-75 μ m), polydimethylsiloxane (PDMS-100 μ m) divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS-65 μ m), carbowax/divinylbenzene (CW/DVB-70 μ m), and divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS-50/30 μ m) that is showed be the more efficient fiber in trapping the volatiles compounds. The optimization of the extraction conditions was carried out using multivariate strategies such as factorial design and response surface methodology. Eighty three compounds were identified by GC/MS under the optimum conditions of extraction and the majority was constituted by esters,

Keywords: malagueta chili pepper, central composite design, GC/MS.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas, assim como os pimentões, são frutos de plantas anuais pertencentes à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*. Este gênero possui mais de 200 espécies que são cultivadas em diversos lugares do planeta.¹ O interesse pelo seu cultivo deve-se ao emprego das pimentas e dos pimentões como condimentos em preparações culinárias, principalmente pelas suas características de pungência, aroma e cor.^{2,3} Além disso, a indústria de alimentos os emprega largamente como agentes colorantes e flavorizantes em molhos, sopas, carnes processadas, lanches, doces e bebidas alcoólicas.⁴ Devido a esta ampla utilização, os caracteres sensoriais proporcionados pelos frutos de *Capsicum* são um importante fator para a qualidade de alimentos que os contenham em suas formulações. Os parâmetros de qualidade mais importantes para *Capsicum* são pungência e cor, no entanto, um número crescente de pesquisas de avaliação da qualidade de alimentos têm se concentrado na caracterização de voláteis para a compreensão do aroma dos alimentos.^{5,6,7} Embora existam trabalhos na literatura que reportem uma composição química complexa para voláteis em alguns tipos de *Capsicum*, com centenas de componentes identificados, é de conhecimento comum que a real importância destes é pouco conhecida para o seu aroma.^{8,9,10} Cabe também ressaltar que esta fração volátil pode apresentar consideráveis modificações nos seus constituintes conforme a variedade pesquisada, local de cultivo, processamento e/ou grau de maturação. Assim, trabalhos relacionados à caracterização da fração volátil de pimentas constituem assunto de contínuo interesse de pesquisadores em diversos países.^{3,4,11}

O trabalho analítico de caracterizar a fração volátil de pimentas pode ser resumido no isolamento dos compostos voláteis, sua separação cromatográfica e posterior identificação e quantificação. Para a etapa de extração, podem ser empregadas metodologias como a extração e destilação simultâneas (SDE, “*simultaneous steam-distillation-solvent*”), o trapeamento sob vácuo do *headspace* entre a amostra e o frasco fechado (“*purge and trap*”) e a microextração em fase sólida (SPME, “*Solid Phase Microextraction*”).^{3, 8, 12, 13}

A SPME apresenta algumas vantagens quando comparada às demais técnicas descritas, tais como simplicidade, rapidez, possibilidade de trabalho com pequenas quantidades de amostra, ausência de solventes, sensibilidade adequada e baixo custo. Além disso, o emprego desta técnica sem as morosas etapas de uso de solventes orgânicos ou de temperaturas nas etapas de extração e concentração diminui a possibilidade de formação de artefatos na fração extraída.¹⁴

Considerando que a SPME é uma técnica que se fundamenta em processos físico-químicos de equilíbrio entre a matriz e o *headspace* e entre o *headspace* e o material de recobrimento da fibra; o sucesso do seu emprego, depende de fatores como a natureza química dos compostos a serem extraídos, da correta escolha do tipo de material de recobrimento da fibra, da temperatura utilizada na extração, bem como do tempo de exposição ao *headspace*.¹⁵

Em casos como este, onde os fatores que influenciam na resposta do sistema são muitos, a otimização do procedimento de extração pode ser realizada com ferramentas estatísticas multivariadas. Estas fornecem informações seguras sobre as melhores condições de análise, sobre a existência ou não de erros

experimentais, além de revelarem as interações que por ventura existam entre os fatores envolvidos.¹⁶

Este trabalho tem como objetivo apresentar a otimização multivariada das condições de extração da fração volátil de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME), a ser aplicada na caracterização dos voláteis de diversas espécies de *Capsicum* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras: As amostras de pimenta malagueta utilizadas neste estudo (cerca de 2,0 kg), foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) na cidade de Campinas, São Paulo - Brasil. Os genótipos selecionados para o estudo foram obtidos do banco de germoplasma do setor de Hortaliças do IAC - Campinas. A identificação botânica das plantas foi realizada pela Dr^a. Arlete Marchi Tavares de Melo, pesquisadora do IAC - Campinas. As amostras utilizadas para otimização encontravam-se em estádios de maturação fisiológica (desenvolvimento máximo em tamanho, porém ainda imaturas). Estas foram colhidas pela parte da manhã, e imediatamente transportadas para o laboratório para as análises.

2.2. Preparo das amostras e procedimentos de SPME: Para as análises, primeiramente, alíquotas de 100 g de frutos inteiros de pimenta, foram triturados em liquidificador, após, pesou-se 1,00 g da amostra triturada em frascos para

SPME de 15,0 mL dotados de tampa rosqueada e septo de PTFE/silicone (Supelco - Bellefonte, PA, USA).

As fibras para SPME utilizadas neste estudo (Supelco - Bellefonte, PA, USA), foram: N^o 57328, 50/30µm divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), N^o 57346, 65µm divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS), N^o 57338, 70µm carbowax /divinilbenzeno (CW/DVB), N^o 57344, 75µm carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) e N^o 57342, 100µm polidimetilsiloxano (PDMS). Estas foram devidamente condicionadas antes do uso, segundo as recomendações do fabricante. Para a seleção preliminar, todas as fibras foram testadas a fim de selecionar a que apresentasse a melhor capacidade de captura dos voláteis da pimenta. Nesta etapa, todas as fibras foram expostas no *headspace* da amostra conforme as seguintes condições: tempo de equilíbrio de 15 min, tempo de extração 30 min, temperatura de extração 40 °C (condições arbitrariamente estabelecidas pelos autores na etapa de escolha da fibra); depois da extração, as fibras foram introduzidas no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos a uma temperatura de 250 °C em modo *splitless*, por um período de 1,0 min. Após os procedimentos de extração e dessorção, cada uma das fibras foi recondicionada por 15 min a 250 °C, com exceção da CW/DVB que foi recondicionada a 220 °C, segundo a recomendação do fabricante. O procedimento de recondicionamento das fibras foi realizado para garantir a inexistência de picos nos brancos de corrida e a boa qualidade dos procedimentos de extração por SPME e cromatográficos. Todas as fibras foram testadas em triplicata e os resultados apresentados representam as médias das mesmas.

2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC-FID): como o conhecimento da identidade dos compostos não é necessário para a etapa de otimização das condições de SPME, e devido à excelente estabilidade e facilidade de operação do detector de ionização em chama (FID, “*Flame Ionization detector*”), esta primeira etapa do trabalho foi realizada em um cromatógrafo a gás, marca Varian 3800 GC dotado de um detector do tipo FID e equipado com a Workstation “Star Chromatography” (versão 4.5). Uma coluna capilar de sílica fundida SPB-5 (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm de fase estacionária) da Supelco (Bellefonte, PA, USA) foi utilizada para a separação dos compostos voláteis da amostra. As condições instrumentais utilizadas foram: injetor no modo *splitless* por 1,0 min, a 250 $^{\circ}\text{C}$, gás de arraste: hidrogênio a 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; rampa de temperatura do forno: 40 $^{\circ}\text{C}$, com incremento de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$ e permanecendo nesta temperatura por 4 min; temperatura do detector 250 $^{\circ}\text{C}$.

2.4. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS): as análises por GC/MS foram realizadas em um equipamento Shimadzu (Japão) modelo GC-17A/QP-5000 sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μm) da J&W Scientific (EUA); injetor: modo *splitless* por 1,0 min, a 250 $^{\circ}\text{C}$; gás de arraste hélio a 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, rampa de temperatura do forno: 40 $^{\circ}\text{C}$, com incremento de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 4 min; temperatura da interface: 240 $^{\circ}\text{C}$, fonte de ionização por elétrons a +70 eV; analisador de massas do tipo quadrupolo simples monitorando faixa de 35-350m/z.

Uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₆–C₂₀) (PolyScience, Illinois, EUA) foi colocada em um frasco próprio para SPME, e submetido a extração e injeção, sob as mesmas condições da amostra, para fins de cálculo dos índices de retenção de Van den Dool e Kratz (LTPRI – *linear temperature programmed retention index*) dos compostos voláteis. A identificação tentativa dos componentes foi realizada comparando-se os LTPRI e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e LTPRI da literatura (Adams, 2007¹⁵ e NIST, 2005), com similaridade de ao menos 80% para os espectros de massa, e variação máxima nos LTPRI de ± 10 .

2.5. Estratégia de otimização: a otimização das condições de HS-SPME foi realizada pelo uso de um delineamento composto central rotacional (DCCR), baseado num planejamento fatorial 2², com quatro pontos axiais ($\alpha = 1,4142$) e quatro pontos centrais.¹⁶ Para a otimização do HS-SPME, as variáveis escolhidas foram temperatura (T, °C) e tempo de extração (t, min); os níveis de cada variável podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores, níveis e domínio experimental das condições aplicadas para otimizar a extração por HS-SPME.

Variáveis	Variáveis codificadas				
	$-\alpha^a$	-1	0	1	α^a
Temperatura de extração (T°C)	12	20	40	60	68
Tempo de extração (t.ext.,min)	52	60	80	100	108

^a $\alpha = 1,4142$

Os demais parâmetros como a quantidade de amostra, volume do *headspace* e tempo de equilíbrio, foram arbitrariamente fixados pelos autores.

Doze experimentos foram realizados em forma randomizada. Para as análises estatísticas, utilizou-se o software Statistica v. 7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1, pode-se observar os resultados de área total obtidos para cada uma das cinco fibras de SPME testadas quanto à capacidade de captura da fração volátil da pimenta malagueta. Cada fibra foi exposta ao *headspace* nas mesmas condições de tempo de equilíbrio, tempo de exposição e temperatura, e embora os parâmetros de extração sejam os mesmos, as diferenças nas áreas obtidas revelam o comportamento de cada tipo de recobrimento frente a cada fibra testada.

Apesar das médias das áreas totais obtidas não terem apresentado diferenças estatísticas significativas entre si (Tukey a $p < 0,05$), optou-se pela fibra DVB/CAR/PDMS, visto que esta apresentou um maior número de picos nos cromatogramas, provavelmente por possuir três diferentes materiais de recobrimento na sua composição, reunindo assim, em uma única fibra, as vantagens do uso de cada material de recobrimento separadamente. Além disso, a literatura reporta o uso da fibra DVB/CAR/PDMS no estudo do aroma de frutos frescos (voláteis e semi-voláteis) como um adequado recobrimento para a captura de compostos relacionados ao aroma.¹⁷

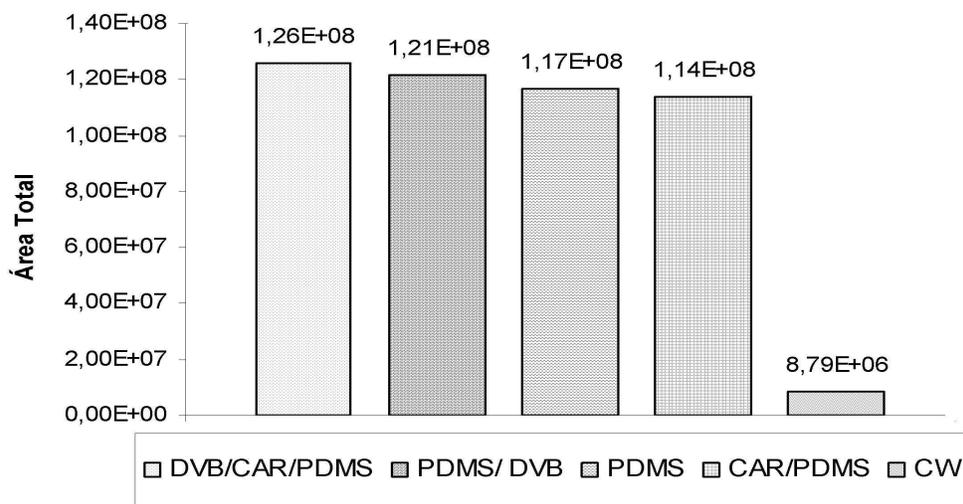


Figura 1. Eficiência do recobrimento das fibras de SPME na extração dos compostos de voláteis de pimenta malagueta por HS-SPME. Resultados expressos como média das triplicatas da área total dos cromatogramas por GC-FID.

Na Figura 2 pode-se visualizar o diagrama de Pareto, onde estão sumarizados os resultados obtidos com o delineamento experimental. Neste, pode-se verificar que todos os fatores avaliados foram significativos a 95% de confiança. Com base nesta informação, estes fatores foram utilizados para o delineamento experimental a fim de se obter as melhores condições de temperatura de extração e tempo de exposição. Foram ainda realizados experimentos no ponto central (n=4), com o objetivo de se estimar o erro puro e detectar possível falta de ajuste do modelo.

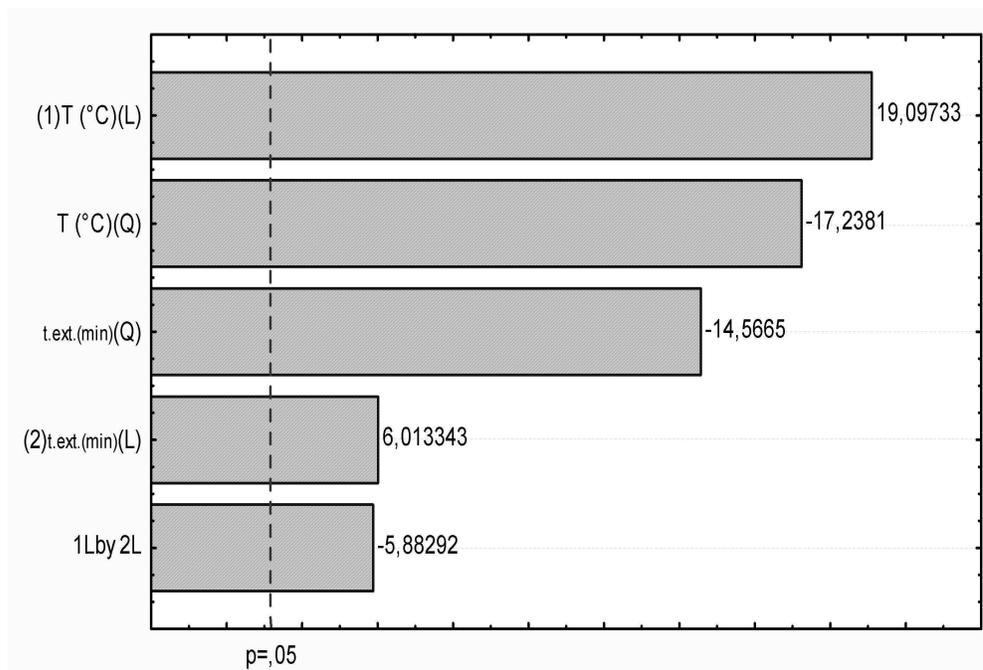


Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, 12 experimentos, Erro puro = 1,99E+12.

Na Tabela 2, encontram-se as respostas de área total dos cromatogramas obtidos nesta etapa do experimento, enquanto que, na Figura 3 podem ser observados os perfis cromatográficos obtidos nos níveis experimentais dos fatores testados no DCCR. A distribuição dos cromatogramas nesta figura obedece ao planejamento, com os pontos de mínimo e máximo de cada parâmetro nas extremidades e, entre eles, os pontos axiais. O cromatograma no centro é relativo a uma das quatro repetições no ponto central. Essa figura revela um aumento das áreas dos picos na condição central do planejamento, ou seja, com temperatura de 40 °C e com 80 min de tempo de extração. O fato de se verificar um cromatograma mais rico em número de compostos e área em uma temperatura não superior a 40 °C é uma vantagem, visto que diversos trabalhos relatam a

possibilidade de degradações e formação de artefatos em temperaturas elevadas. Ademais, o tempo de 80 min como ótimo de extração possivelmente foi influenciado pelo material de recobrimento da fibra, pois a existência de recobrimentos sólidos como o CAR e o DVB apresentam mecanismos de adsorção, que normalmente são mais lentos que a partição observada no filme líquido de PDMS. ^{15, 17}

A validação do modelo matemático que descreve a superfície de resposta para o DCCR foi realizada através de análise de variância (ANOVA), uma vez que os resultados da regressão são os mais adequados para evidenciar a existência ou não de falta de ajuste do modelo e decidir se é possível fazer previsões com base neste último. ¹⁶

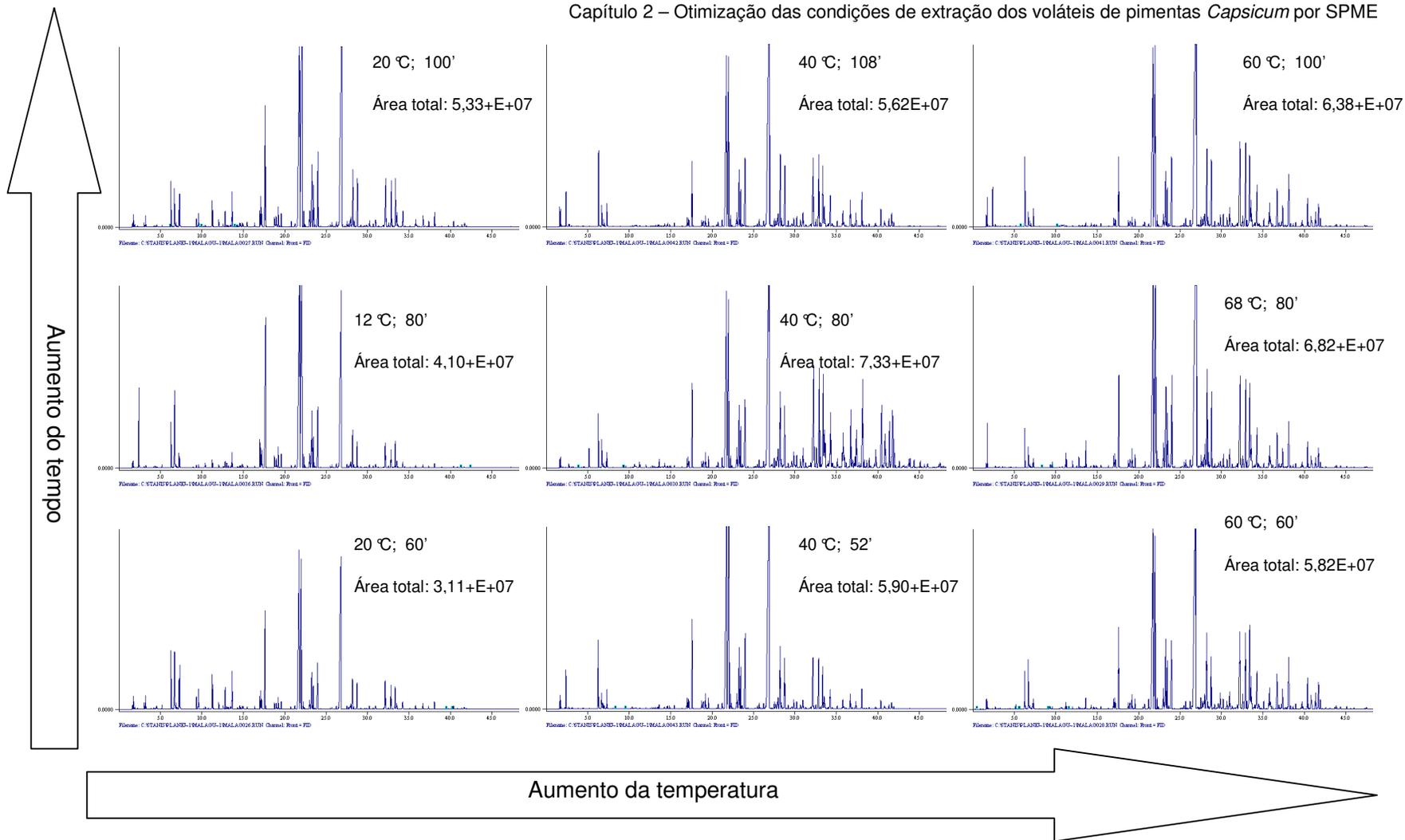


Figura 3. Cromatogramas do *headspace* da pimenta malagueta imatura por HS-SPME, obtidos em cada experimento do delineamento experimental; as setas indicam o sentido do aumento dos níveis dos fatores tempo e temperatura.

Tabela 2. Condições experimentais e valores da resposta (área total) obtidas no DCCR, na etapa de otimização das condições de extração dos compostos voláteis de pimenta malagueta imatura (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME.

Experimento número	T (°C)	Temperatura de extração	t.ext. (min)	Tempo de extração	Resposta (área total ^a)
1	-1	20	-1	60	3,11E+07
2	1	60	-1	60	5,82E+07
3	-1	20	1	100	5,33E+07
4	1	60	1	100	6,38E+07
5	-1,41	12	0	80	4,10E+07
6	1,41	68	0	80	6,82E+07
7	0	40	-1,41	52	5,90E+07
8	0	40	1,41	108	5,62E+07
9	0	40	0	80	7,33E+07
10	0	40	0	80	7,20E+07
11	0	40	0	80	7,09E+07
12	0	40	0	80	7,01E+07

^a Área total expressa em unidade arbitrária.

Na Tabela 3, encontram-se os resultados de ANOVA, nesta verifica-se que a significância estatística da regressão dada pela razão entre a média dos quadrados da regressão pela média quadrática dos resíduos (MQ_R/MQ_r) ou $F_{\text{calculado}}$, é de 11,85; e que, quando comparado ao nível de significância de 95% com o valor de $F_{\text{tabulado}} (5, 6, 95\%)$; que neste caso é de 4,39, verifica-se que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$ cerca de 2,7 vezes, o que indica a existência de uma adequada correlação entre as variáveis estudadas.

No entanto, ao se analisar a significância estatística da falta de ajuste do modelo, dada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$); que para um bom ajuste do modelo deve apresentar $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$, verifica-se que o modelo obtido apresenta falta de ajuste aos resultados experimentais, o que impossibilita fazer previsões sobre a resposta (valores de área total) para outras temperaturas e outros tempos de extração, com base no modelo obtido. Embora tal falta de ajuste tenha sido

verificada, os resultados encontrados através dos experimentos realizados são reais e válidos, e portanto, a condição ótima obtida de temperatura de extração e tempo de exposição pode ser utilizada uma vez que fornece os maiores valores de área total nos cromatogramas de pimenta. Destaca-se que o desvio padrão relativo (CV%) para os valores de área total obtidos no ponto central do DCCR foi de apenas 1,97% indicando adequada repetibilidade do método desenvolvido nesta condição. Destaca-se também

Tabela 3. Análise da variância pelo método dos mínimos quadrados, para os parâmetros temperatura e tempo de extração dos compostos voláteis de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Media dos quadrados	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	1,71E+15	5	3,42E+14	11,85	4,39	2,70
Resíduos	1,73E+14	6	2,89E+13			
Falta de ajuste	1,67E+14	3	5,58E+13	28,06	9,28	3,02
Erro puro	5,96E+12	3	1,99E+12			
Total	1,89E+15	11				
R ²	0,908					

% variação explicada: 90,81

máxima % de variação explicada: 99,68

A superfície de resposta obtida no DCCR pode ser observada na Figura 4. Os valores ótimos de tempo de extração e temperatura de extração foram de 40 °C e 80 min.

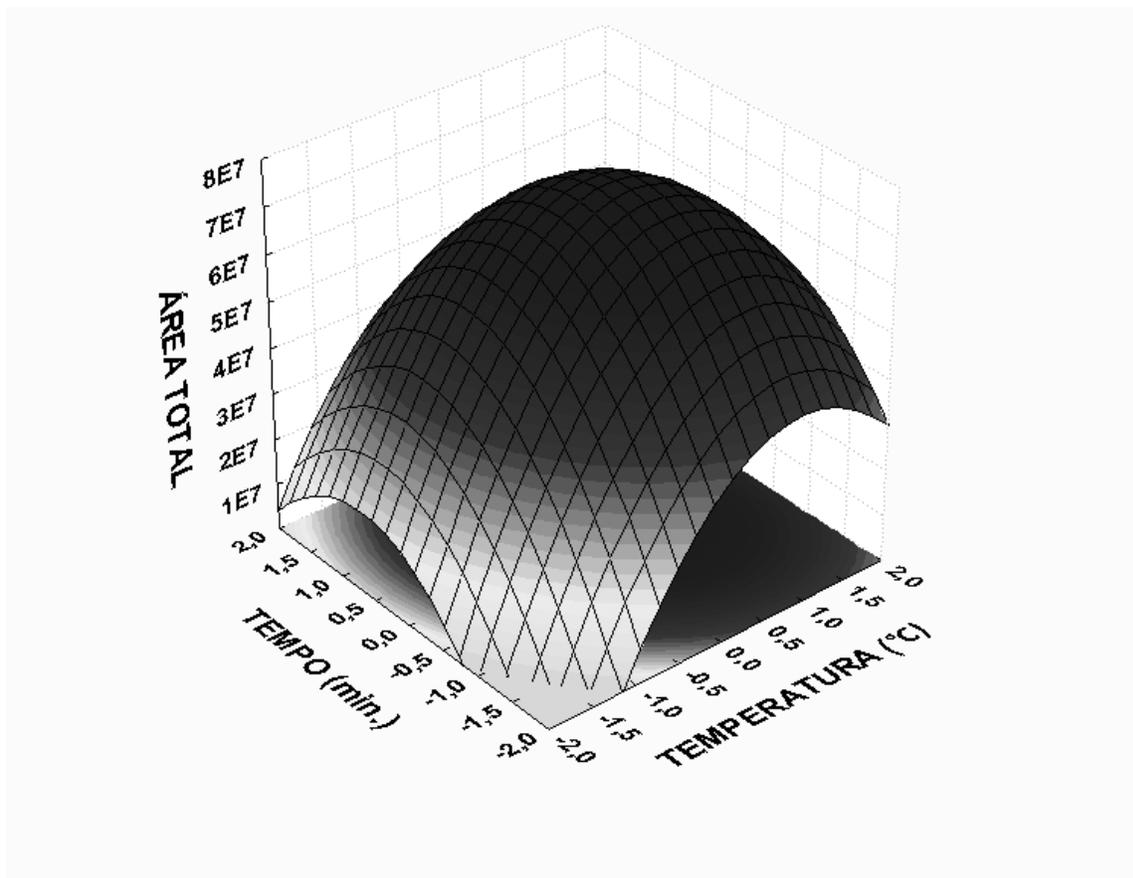


Figura 4. Superfície de resposta obtida pelo modelo quadrático: $y = 7,16E+07 + 9,53E+06 * T - 9,65E+06 * T^2 + 3,00E+06 * t - 8,15E+06 * t.^2 - 4,15E+06 * T * t$, para a otimização das condições de temperatura de extração (T, °C) e tempo de extração (t. min) dos voláteis de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da comparação da eficiência de extração de cada fibra, testadas sob as condições descritas no ponto central do DCCR, para pimenta malagueta imatura por GC/MS.

Verifica-se a presença de diversas classes químicas nos voláteis da amostra, tais como ésteres, alcoóis, aldeídos, terpenos, alcanos e cetonas. A fibra que extraiu a maior quantidade de compostos foi a DVB/CAR/PDMS, seguida da CAR/PDMS, PDMS, DVB/PDMS e CW.

Tabela 4. Compostos voláteis identificados em pimenta malagueta imatura (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME e GC/MS.

Compostos	LTPRI Cal	LTPRI Lit	Δ	Fibras de SPME					
				DVB/ CAR/ PDMS	CAR/ PDMS	PDMS	DVB/ PDMS	CW	
Alcoóis									
2-propanol	474	482	8	x	x				
1-pentanol	765	761	-4	x	x				
4-metil-pentanol	833	831	-2	x	x	x			
(Z)-4-hexenol	853	857	4	x	x				
1-hexanol	866	860	-6	x	x	x	x	x	
(E)-2-hexen-1-ol	866	868	2	x	x				
1-octanol	1066	1057	-9	x	x	x	x		
4-butoxi-1-butanol	1139	1135	-4	x	x	x	x	x	
2-decanol	1179	1178	-1	x	x	x	x		
(E)-2-(E)-4-nonadien-1-ol	1196	1200	4	x	x	x	x	x	
1-decanol	1260	1260	0	x	x	x	x		
(Z)-acetato-6-nonen-1-ol	1294	1290	-4	x	x	x	x	x	
10-undecen-1-ol	1346	1347	1	x	x				
(E)-2-undecen-1-ol	1355	1355	0	x		x	x	x	
2,2-dimetil-1-decanol	1363	1372	9	x	x	x	x		
1-dodecanol	1562	1564	2	x		x	x	x	
1-tridecanol	1563	1572	9	x	x	x	x		
(E)-3-pentadecen-2-ol	1677	1683	6	x	x	x			x
Aldeídos e Cetonas									
2-metil-butanal	649	643	-6	x	x				
hexanal	801	806	5	x	x				
(E)-2-hexenal	851	850	-1	x	x	x	x		
heptanal	872	873	1	x	x	x			
5-metil-5-octen-2-ona	1040	1037	-3	x	x	x	x		
2-nonanona	1055	1052	-3	x	x	x	x		
(Z)-2-decenal	1218	1212	-6	x	x	x	x	x	
dodecanal	1392	1390	-2	x	x				
(E)-2-dodecanal	1447	1442	-5	x		x	x		
(Z)-2-dodecanal	1449	1447	-2	x	x	x	x		
mirac aldedo	1485	1488	3	x		x	x		
tridecanal	1493	1494	1	x	x	x	x		
2(E)-tridecenal	1543	1549	6	x	x	x	x		
tetradecanal	1592	1599	7	x	x		x		
Ésteres									
hexanoato de etila	968	978	10	x			x		
acetato de hexila	978	984	6	x	x	x	x		
2,2-dimetil propanoate de butila	1003	999	-4	x	x		x		
isovalerato de butila	1007	1005	-2	x	x	x	x		
isobutirato de isopentila	1013	1014	1	x	x		x		
piruvato de isoamila	1050	1051	1	x	x				
isobutirato de prenila	1060	1050	-10	x	x	x	x		
butirato de pentila	1094	1095	1	x	x	x	x		

Continuação da Tabela 4

2-metilbutanoato de 2-metilbutila	1100	1104	4	x	x	x	x	
isovalerato de 2-metilbutila	1106	1109	3	x		x	x	
isobutirato de hexila	1113	1118	5	x	x	x	x	
acetato de 7-metil-4-octila	1148	1154	6	x	x	x	x	
butanoato de hexila	1157	1155	-2	x	x	x	x	x
butirato de (E)-3-hexenila	1187	1191	4	x		x		
2,2-dimetilpropanoato de hexila	1201	1197	-4	x		x		
3-metilbutanoato de hexila	1208	1202	-6	x	x	x	x	x
hexanoato de 2-metilbutila	1215	1218	3	x	x	x		
isopentanoato de (Z)-3-hexenila	1231	1226	-5	x	x	x	x	x
butanoato de (Z)-3-hexenil-2-metila	1232	1231	-1	x	x	x	x	
butanoato de 2-metil-hexila	1237	1239	2	x	x	x	x	x
butanoato de 3-metil-hexila	1242	1243	1	x	x	x	x	x
isobutanoato de heptila	1247	1248	1	x	x	x		
hexanoato de 3-metil-2-butenila	1263	1273	10	x	x	x	x	
pentanoato de (Z)-3-hexenila	1284	1282	-2	x	x	x	x	
pentanoato de hexila	1289	1282	-7	x	x	x	x	
carbonato de butil isohexila	1303	1294	-9	x		x		x
2,2-dimetilpropanoato de heptila	1306	1297	-9	x	x	x	x	
2-metilbutirato de heptila	1311	1317	6	x	x	x		
hexanoato de 2-metilpentila	1316	1317	1	x	x	x	x	
geranoato de metila	1330	1322	-8	x	x	x	x	
2,2-dimetilpropanoato de 2-etil hexila	1335	1332	-3	x		x	x	x
carbonato de alil heptila	1340	1348	8	x	x	x	x	x
acetato de (E)-5-decenila	1387	1389	2	x	x	x	x	x
2-metilbutanoato de benzila	1394	1394	0	x	x			
pivalato de octila	1402	1396	-6	x		x	x	
decanoato de aliila	1463	1471	8	x	x	x	x	
Terpenos								
(E)- β -ocimeno	1047	1041	-6	x	x	x	x	
α -copaeno	1373	1375	2	x		x	x	
β -cariofileno	1415	1410	-5	x	x			
α -ionone	1428	1421	-7	x	x			
cadinadieno	1440	1440	0	x		x	x	
(E)- β -farneseno	1456	1452	-4	x		x	x	
α -selineno	1475	1474	-1	x		x	x	x
β -(E)-bergamoteno	1480	1483	3	x	x	x	x	
β -ionona	1486	1480	-6	x	x		x	
Δ -cadineno	1521	1518	-3	x	x			
Alcanos								
undecano	1103	1100	-3	x	x		x	
(Z)-3-tetradeceno	1421	1421	0	x	x	x	x	
1-pentadeceno	1490	1489	-1	x				
pentadecano	1499	1500	1	x	x	x	x	
1-hexadeceno	1581	1589	8	x		x	x	
hexadecano	1598	1600	2	x	x	x	x	
(Z)-7-hexadeceno	1614	1620	6	x	x		x	
heptadecano	1698	1700	2	x	x	x	x	
Total de compostos identificados				83	69	65	63	18

LTPRI_{Calc.} = índices de retenção obtidos usando coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.LTPRI_{Lit.} = índices de retenção obtidos usando coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano. Δ = diferença entre os índices de retenção da literatura e calculado; LTPRI_{Lit.} – LTPRI_{Calc.}

Considerando a polaridade dos materiais de recobrimento, o PDMS é o mais apolar, seguido da mistura CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, DVB/PDMS e CW. Esta última possui natureza polar, fato que provavelmente está relacionado à capacidade que este material de recobrimento apresentou de capturar compostos de natureza mais polares como alcoóis, aldeídos e ésteres. Enquanto que, a polaridade intermediária da DVB/CAR/PDMS associada à natureza mista do seu recobrimento (existência de meso-macroporos, resultado da rugosidade do filme líquido de PDMS, associado aos poros sólidos do CAR e do DVB), provavelmente estão relacionados à sua capacidade de apresentar maior capacidade de captura de voláteis, quando comparada às demais.^{15,17}

No total, 83 compostos foram tentativamente identificados na fração volátil da amostra. Embora muitos deles já tenham sido descritos em outras espécies vegetais, são todos inéditos em pimenta malagueta.^{4,6,7,9,11}

4. CONCLUSÕES

A metodologia de microextração em fase sólida de *headspace* se mostrou eficiente para extrair os voláteis de pimenta malagueta imatura, apresentando boa repetibilidade. A otimização multivariada das condições de extração permitiu conhecer os melhores valores de tempo e temperatura para extração. Os resultados da identificação tentativa por GC/MS dos voláteis obtidos, nas condições de extração otimizada, revelaram uma composição química complexa com 83 componentes, predominantemente ésteres.

5. REFERÊNCIAS

1. Mosquera, M. I. M. & Mendez, D. H. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 38-44.
2. Pruthi, J. S. *Spices and condiments*. In Chichester, E. M. & Stewart, G. F. (Eds.). **1980**. New York: Academic Press.
3. Sousa, E.T.; Rodrigues, F.M.; Martinsa, C.C.; et al. *J.B. Microchem. J.* **2006**, 82, 142-149.
4. Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; et al. *Food Chem.* **2007**, 104, 1682-1686.
5. van Ruth, S.; Boscainib, E.; Mayr, D.; et al. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223–224, 55–65.
6. Cremer, D. R., & Eichner, K. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 2454-2460.
7. Luning, P.A.; de Rijk, T.; Wichers, H.J.; et al. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 977-983.
8. Pino, J.; Sauri-Duchb, E. & Marbot, R. *Food Chem.* **2006**, 94, 394–398.
9. Mazida, M.M.; Salleh, M. M. and Osmanet, H. *J. Food Comp.Anal.* **2005**, 18 427-437.
10. Forero, M. D.; Quijano, C.E., Pino, J.A. *Flavour Fragr. J.* **2009**, 24, 25-30.
11. Kim, I.-K.; El-Aty, A.M.A.; et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45, 487-494.
12. Wu, C.M & Liou, S.E. *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 770-772.
13. Guadayol, J. M.; Caixach, J.; Ribé, J.; et al. J.; *J Agriculture Food Chem.* **1997**, 45, 1868–1872.
14. Kataoka, H.; Lord, H.; Pawliszyn, L. *J. Chrom. A.* **2000**, 35-62.
15. Nongonierma, A.; Cayot P.; Le Queacutereacute, J.L.; et al. *Food Rev. Int.*, **2006**, 22, 51 - 94.

16. Ferreira S. L. C.; Bruns, R. E. ; Silva, E. G. P.; et al. *J. Chromatography A*. **2007**, 1158, 2-14.
17. Carasek & Pawliszyn. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8688-8696.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM PIMENTAS MALAGUETA (*CAPSICUM FRUTESCENS*), DEDO-DE-MOÇA (*CAPSICUM BACCATUM* VAR. PENDULUM) E MURUPI (*CAPSICUM CHINENSE*) EM DOIS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO, POR SPME E GC/MS

Stanislau Bogusz Junior¹ & Helena Teixeira Godoy¹

Artigo segundo as normas de publicação 2009 da revista Química Nova.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6121, Campinas – SP, Brasil.

ABSTRACT

VOLATILE COMPOUNDS OF *CAPSICUM FRUTESCENS*, *CAPSICUM BACCATUM* VAR. *PENDULUM* AND *CAPSICUM CHINENSE* AT TWO RIPENING STAGES: In this study, the volatile fractions of three varieties of chili peppers in two stages of maturity were characterized using headspace solid phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography (GC-FID) and mass spectrometry (GC/MS). A total of 83 compounds were identified in malagueta chili pepper (*Capsicum frutescens*) mostly esters and alcohols, in dedo-de-moça chili pepper (*Capsicum baccatum var. pendulum*) 50 compounds were identified, mostly monoterpenes and sesquiterpenes and in murupi chili pepper (*Capsicum chinense*) 79 compounds were identified, mostly esters and sesquiterpenes. The peak areas of compounds in the three samples showed a trend of decrease with the maturation process, especially in samples of *Capsicum baccatum var. pendulum*, in which most of the compounds disappeared during ripening.

Keywords: *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum var. pendulum*, volatiles compounds, GC/MS.

1. INTRODUÇÃO

Pimentas do gênero *Capsicum*, são especiarias muito populares em diversas partes do mundo, utilizadas principalmente pelos seus atributos de cor, pungência e aroma.^{1,2} Industrialmente, são utilizadas como agentes colorantes e flavorizantes em molhos, sopas, carnes processadas, lanches, doces e bebidas alcoólicas.⁴ Além disso, podem ser consumidas frescas, secas, em conservas ou na forma de molhos de pimenta. São também empregadas na medicina tradicional pelas suas propriedades antimicrobianas, anticonvulsivas e sedativas.^{5, 6, 7}

O Brasil é considerado um centro de diversidade genética e um dos maiores produtores mundiais de pimentas *Capsicum*. No ano de 2005, as pimentas deste gênero alcançaram o posto de segunda hortaliça mais exportada pelo país, com um volume de exportação de 9.222 toneladas.⁸ Dentre as variedades domesticadas cultivadas no seu território, algumas das mais populares são as pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*).

Embora a pungência seja um dos mais importantes atributos dos frutos de *Capsicum*, diversos trabalhos na literatura têm se ocupado também da análise de sua fração volátil, uma vez que os compostos químicos presentes nesta fração possuem uma relação direta com o *flavor* das mesmas.^{2, 4, 9} Contudo, a tarefa analítica de caracterizar os voláteis de uma amostra não é simples. No caso de pimentas, diferentes métodos analíticos têm sido desenvolvidos e empregados na análise de amostras frescas, secas e processadas. Os métodos de extração mais comumente empregados são a extração e destilação simultâneas (SDE) e o trapeamento do *headspace* da amostra (*purge and trap*). Entretanto, estes

métodos são normalmente laboriosos, onerosos, demorados e muitas vezes podem fornecer resultados errôneos sobre a real composição dos voláteis, pois podem induzir a formação de artefatos durante as etapas de preparo das amostras, uso de diferentes solventes e na eliminação destes nos processos de concentração dos voláteis obtidos.¹⁰ Uma alternativa a estes métodos é a microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME, “*Headspace-Solid Phase Microextraction*”). Esta por se tratar de uma técnica de extração e concentração de voláteis sem uso de solventes, normalmente permite alcançar os limites de detecção necessários para uma adequada caracterização. Além disso, ela é relativamente simples, rápida e requer poucos dispositivos de instrumentação se comparada a outras técnicas de isolamento de voláteis.¹¹

Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar e acompanhar possíveis modificações nos compostos voláteis presentes nas pimentas malagueta, dedo-de-moça e murupi cultivadas no Brasil, segundo diferentes estádios de maturação com uso de HS-SPME, cromatografia gasosa (GC, “*Gas Chromatography*”) hifenada a detector de ionização em chama (FID, “*Flame Ionization detector*”) e GC acoplada à espectrometria de massas (MS, “*Mass Spectrometry*”).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras: As amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi (cerca de 2 kg de cada espécie) foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) na cidade de Campinas, São Paulo - Brasil. Os genótipos selecionados para o estudo foram obtidos do banco de germoplasma do setor de

Hortalças do IAC - Campinas. As plantas foram cultivadas sob tratamentos similares de fertilizantes e irrigação, em dois períodos, sendo um de abril a julho de 2008 e o outro de janeiro a maio de 2009. A identificação botânica das plantas foi realizada pela Dr^a. Arlete Marchi Tavares de Melo, pesquisadora do IAC - Campinas. As amostras de pimenta foram coletadas em dois estádios de maturação: fisiológica (desenvolvimento máximo em tamanho, porém ainda imaturas) e comercial (desenvolvimento completo em tamanho e cor). Estas foram colhidas pela parte da manhã, e imediatamente transportadas para o laboratório para as análises.

2.2. Preparo das amostras: para a extração dos voláteis, empregou-se HS-SPME como segue: alíquotas de 100 g de frutos inteiros de pimenta foram triturados em liquidificador, após, pesou-se 1,00 g da amostra triturada em frascos para SPME de 15,0 mL dotados de tampa rosqueada e septo de PTFE/silicone (Supelco - Bellefonte, PA, USA). A fibra de SPME utilizada neste estudo foi uma divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30 μ m, (DVB/CAR/PDMS), n^o 57328, obtida da Supelco - Bellefonte, PA, USA. Esta foi devidamente condicionada antes do uso, segundo as recomendações do fabricante. Os voláteis foram extraídos sob as seguintes condições: temperatura de extração 40 °C, tempo de equilíbrio 15 min e tempo de extração 80 min. Depois da extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos a uma temperatura de 250 °C em modo *splitless*, por um período de 1,0 min. Além disso, após cada procedimento de extração e dessorção, realizou-se o condicionamento da fibra por 15 min a 250 °C, segundo a recomendação do

fabricante. Tal procedimento foi realizado para garantir a inexistência de picos nos brancos de corrida e para garantir a boa qualidade dos procedimentos de extração por SPME. Todas as amostras foram injetadas em triplicata e os resultados apresentados neste trabalho são suas médias.

2.3. Cromatografia em fase gasosa (GC-FID): para a obtenção das áreas dos picos dos compostos voláteis das pimentas, sem a necessidade de cálculos dos fatores de correção para as respostas do detector de massas, as amostras foram também injetadas em um GC marca Varian 3800 GC dotado de um detector de ionização em chama (FID), equipado com a Workstation “Star Chromatography” (versão 4.5). Uma coluna capilar de sílica fundida SPB-5 (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m de fase estacionária) da Supelco (Bellefonte, PA, USA) foi utilizada para a separação dos compostos voláteis da amostra. As condições instrumentais utilizadas foram: injetor (modo e temperatura): *splitless* por 1,0 min, a 250 $^{\circ}$ C; gás de arraste: hidrogênio a 1,0 mL.min⁻¹; rampa de temperatura do forno: 40 $^{\circ}$ C, com incremento de 3 $^{\circ}$ C min⁻¹ até 240 $^{\circ}$ C, permanecendo nesta temperatura por 4 min; temperatura do detector 250 $^{\circ}$ C.

2.4. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS): as análises por GC/MS foram realizadas em um equipamento Shimadzu modelo GC-17A/QP-5000 (Japão). Para as separações cromatográficas, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano) (30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m de fase estacionária) da J&W Scientific (EUA). Os

parâmetros instrumentais utilizados foram: injetor: modo *splitless* por 1,0 min, a 250 °C; gás de arraste hélio a 1,0 mL.min⁻¹, rampa de temperatura do forno: 40 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min; temperatura da interface: 240 °C, fonte de ionização por elétrons a +70 eV; analisador de massas do tipo quadrupolo simples monitorando faixa de 35-350m/z.

Uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₆–C₂₀) (PolyScience, Illinois, EUA) foi colocada em um frasco próprio para SPME e submetida à extração e injeção, sob as mesmas condições da amostra, para fins de cálculo dos índices de retenção de Van den Dool e Kratz (LTPRI – *linear temperature programmed retention index*) dos compostos voláteis. A identificação tentativa dos componentes foi realizada comparando-se os LTPRI e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e LTPRI da literatura (Adams 2007¹² e NIST 2005), com similaridade de ao menos 80% para os espectros de massa, e variação máxima dos índices de retenção de ±10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando que a SPME é uma técnica de extração e concentração, resultado de partições e equilíbrios dos voláteis presentes na amostra para o *headspace* e desse para a fibra, para se realizar quantificações que representem o real teor dos componentes presentes em uma amostra, é necessário levar em conta as recuperações individuais de cada componente químico, visto que seus coeficientes de partição variam de composto para composto. Assim, mesmo para uma semi-quantificação seria necessário realizar estas recuperações individuais;

no entanto, dada a complexidade das amostras investigadas, tal procedimento não é factível.¹³ Deste modo, os resultados apresentados neste trabalho como valores da área dos picos obtidos por GC-FID (considerando os fatores de correção da resposta do detector iguais a unidade) não representam a real quantidade dos voláteis na amostra, sendo apenas um parâmetro para comparação das variações dos voláteis para uma mesma amostra segundo seu período de maturação.

3.1. Voláteis em pimenta malagueta

Na Figura 1, encontram-se os cromatogramas obtidos por GC-FID da fração volátil da pimenta malagueta nos estádios maduro e imaturo, enquanto que na Tabela 1, estão os resultados da identificação por GC/MS e das áreas dos picos por GC-FID para as amostras de pimenta malagueta em dois estádios de maturação e em duas colheitas.

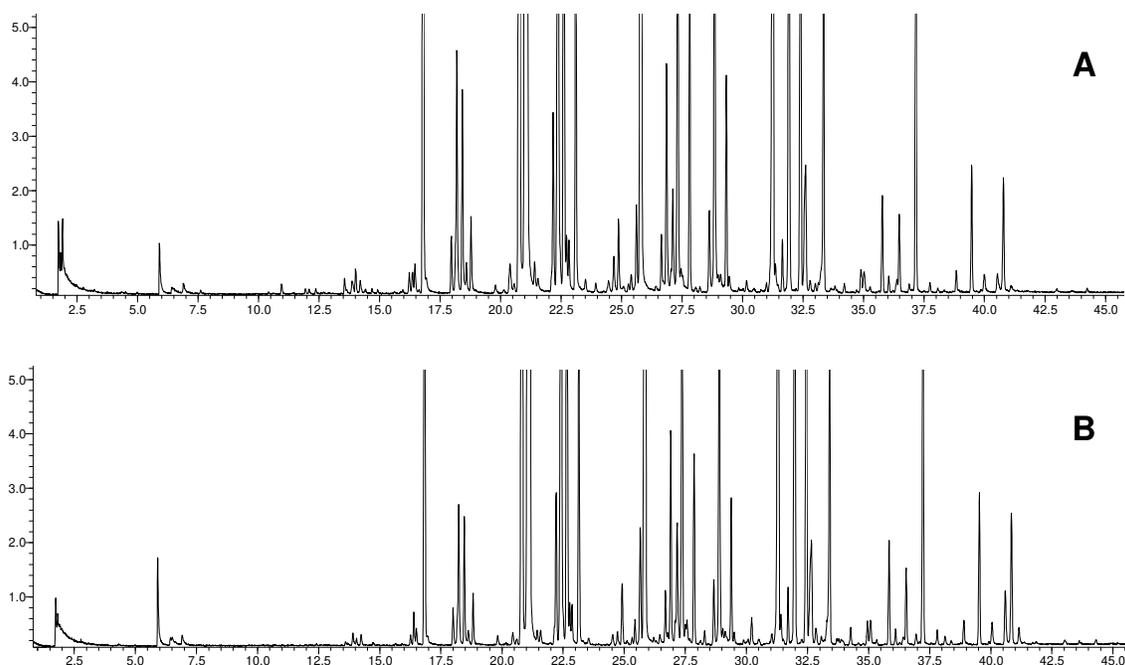


Figura 1. Cromatogramas da fração volátil da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME e GC-FID nos estádios de maturação (A) imaturo e (B) maduro.

Considerando-se todas as amostras de pimenta malagueta analisadas, foram tentativamente identificados 83 compostos, pertencentes às seguintes classes químicas: ésteres (39,76%), alcoóis (21,69%), aldeídos (15,66%), alcanos (9,64%), sesquiterpenos (8,43%), monoterpenos (2,41%) e cetonas (2,41%).

Tabela 1. Compostos voláteis em pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) por HS-SPME, GC-FID e GC/MS, em dois estádios de maturação e dois anos distintos.

Composto	LTPRI _{Cal.}	LTPRI _{Lit.}	Δ	2008		2009	
				Imatura*	Madura*	Imatura*	Madura*
Alcanos							
undecano	1103	1100	-3	0,01	t	0,13	0,11
(Z)-3-tetradeceno	1421	1421	0	0,06	0,03	0,94	0,46
1-pentadeceno	1490	1489	-1	0,10	0,06	0,08	0,02
pentadecano	1499	1500	1	0,03	0,05	0,05	0,02
1-hexadeceno	1581	1589	8	0,06	0,08	0,45	0,17
hexadecano	1598	1600	2	0,65	1,18	2,21	0,74
(Z)-7-hexadeceno	1614	1620	6	0,03	0,06	0,07	0,03
heptadecano	1698	1700	2	0,13	0,29	0,72	0,22
Alcoóis							
2-propanol	474	482	8	0,10	0,03	0,03	0,02
1-pentanol	765	761	-4	0,01	0,01	0,02	0,01
4-metil-pentanol	833	831	-2	0,38	0,81	0,26	0,42
(Z)-4-hexenol	853	857	4	0,41	0,02	0,10	0,10
(E)-2-hexen-1-ol	866	868	2	0,15	0,01	0,13	0,01
1-hexanol	866	860	-6	0,09	0,08	0,02	0,02
4-butoxi-1-butanol	1139	1135	-4	0,02	0,01	0,04	0,02
2-decanol	1179	1178	-1	0,02	0,01	0,01	0,01
(E)-2-(E)-4-nonadien-1-ol	1196	1200	4	0,95	0,07	0,91	0,22
1-decanol	1260	1260	0	0,04	0,02	0,28	0,08
(Z)-acetato-6-nonen-1-ol	1294	1290	-4	0,13	0,19	0,03	0,02
10-undecen-1-ol	1346	1347	1	1,13	0,35	1,24	0,50
(E)-2-undecen-1-ol	1355	1355	0	4,45	2,67	3,76	1,80
2,2-dimetil-1-decanol	1363	1372	9	0,08	0,05	0,07	0,03
1-dodecanol	1562	1564	2	0,09	0,08	0,18	0,04
1-tridecanol	1563	1572	9	0,04	0,01	0,48	0,18
1-tetradecanol	1662	1656	-6	0,01	0,01	0,01	0,01
(E)-3-pentadecen-2-ol	1677	1683	6	0,09	0,12	0,43	0,14

Continuação da Tabela 1

Aldeídos							
butanal	556	558	2	0,03	0,01	0,01	t
2-metil-butanal	649	643	-6	0,01	t	0,01	t
pentanal	701	696	-5	0,01	t	0,01	t
hexanal	801	806	5	0,06	0,01	0,04	t
(E)-2-hexenal	851	850	-1	0,26	0,09	0,24	0,10
(Z)-4-heptenal	871	869	-2	0,04	0,01	t	t
heptanal	872	873	1	0,01	0,01	0,01	-
(Z)-2-decenal	1218	1212	-6	0,02	0,02	0,03	0,01
(E)-2-dodecanal	1447	1442	-5	2,89	3,01	5,47	3,30
(Z)-2-dodecanal	1449	1447	-2	0,29	0,24	0,66	0,24
mirac aldeído	1485	1488	3	0,03	0,09	0,12	0,06
tridecanal	1493	1494	1	0,91	1,00	2,14	0,87
2(E)-tridecenal	1543	1549	6	0,08	0,06	0,04	0,01
Cetonas							
5-metil-5-octen-2-ona	1040	1037	-3	t	t	0,01	0,01
2-nonanona	1055	1052	-3	0,05	0,04	0,10	0,07
Ésteres							
hexanoato de etila	968	978	10	0,02	0,02	0,01	0,01
acetato de hexila	978	984	6	0,43	0,03	0,06	0,01
isovalerato de isobutila	1007	1005	-2	0,01	t	0,06	0,01
isobutirato de isopentila	1013	1014	1	0,01	0,02	0,01	0,01
isobutirato de prenila	1060	1050	-10	0,06	0,01	0,05	0,02
2-metilbutanoato de 2-metilbutila	1100	1104	4	0,04	t	0,22	0,06
isovalerato de 2-metilbutila	1106	1109	3	0,32	0,16	0,25	0,08
isobutirato de hexila	1113	1118	5	2,62	1,85	6,86	2,62
acetato de 7-metil-4-octila	1148	1154	6	0,15	0,16	0,46	0,61
butanoato de hexila	1157	1155	-2	0,12	0,02	0,23	0,06
butirato de (E)-3-hexenila	1187	1191	4	0,31	0,12	0,11	0,08
2,2-dimetilpropanoato de hexila	1201	1197	-4	8,26	7,80	13,81	7,83
3-metilbutanoato de hexila	1208	1202	-6	7,02	6,84	31,79	24,16
hexanoato de 2-metilbutila	1215	1218	3	0,50	0,21	0,28	0,12
isopentanoato de (Z)-3-hexenila	1231	1226	-5	0,02	0,01	0,03	0,01
butanoato de (Z)-3-hexenil-2-metila	1232	1231	-1	1,46	0,34	1,93	0,86
butanoato de 2-metil-hexila	1237	1239	2	4,44	1,61	7,07	3,68
butanoato de 3-metil-hexila	1242	1243	1	2,12	0,82	5,64	3,41
isobutanoato de heptila	1247	1248	1	3,12	1,95	3,45	1,66
hexanoato de 3-metil-2-butenila	1263	1273	10	0,05	0,01	0,09	0,01
pentanoato de (Z)-3-hexenila	1284	1282	-2	0,19	0,04	0,53	0,10
pentanoato de hexila	1289	1282	-7	0,54	0,09	0,48	0,29
carbonato de butil isohexila	1303	1294	-9	0,06	t	0,06	t
2,2-dimetilpropanoato de heptila	1306	1297	-9	0,03	0,02	0,13	0,12
2-metilbutirato de heptila	1311	1317	6	0,18	0,16	0,29	0,37
hexanoato de 2-metilpentila	1316	1317	1	14,06	16,98	12,21	8,93
geranoato de metila	1330	1322	-8	0,08	0,03	0,17	0,02

Continuação da Tabela 1

2,2-dimetilpropanoato de 2-etil hexila	1335	1332	-3	0,03	0,14	1,08	0,71
carbonato de alil heptila	1340	1348	8	0,11	0,26	0,09	0,13
acetato de (E)-5-decenila	1387	1389	2	1,39	1,71	1,36	0,54
2-metilbutanoato de benzila	1394	1394	0	0,09	0,08	0,48	0,28
pivalato de octila	1402	1396	-6	0,44	0,14	0,42	0,03
decanoato de alila	1463	1471	8	0,16	0,10	0,03	0,04
Monoterpenos							
Δ -3-careno	1011	1014	3	0,03	t	0,01	t
(E)- β -ocimeno	1047	1041	-6	0,02	0,03	0,12	0,06
Sesquiterpenos							
β -cariofileno	1415	1410	-5	0,22	0,23	0,06	0,08
α -ionona	1428	1421	-7	0,20	0,25	0,05	0,03
cadinadieno	1440	1440	0	0,14	0,19	0,22	0,20
α -selineno	1475	1474	-1	4,03	1,93	6,93	2,51
β -(E)-bergamoteno	1480	1483	3	1,26	0,25	1,51	0,12
β -ionona	1486	1480	-6	0,01	0,01	0,15	0,08
Δ -cadineno	1521	1518	-3	0,02	0,01	0,05	0,02

*Área dos picos dividida por 10^6 , obtidas por GC-FID (considerando que os fatores de resposta do detector são iguais à unidade), usando coluna capilar de fase estacionária composta por 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano; resultados apresentados como média de triplicatas.

LTPRI_{Calc.} = índices de retenção obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

LTPRI_{Lit.} = índices de retenção da literatura, obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

Δ = diferença entre os índices de retenção da literatura e calculado; LTPRI_{Lit.} - LTPRI_{Calc.}

t = nível traço (área inferior a 0,01).

- = não detectado.

Pode-se verificar que ocorreram claras modificações nas áreas dos voláteis segundo o período de maturação nos dois anos de colheita. De modo geral, percebe-se uma tendência de diminuição destas áreas quando se compara os frutos imaturos e maduros, fato este que já foi verificado anteriormente em outros trabalhos com frutos do gênero *Capsicum*.^{4, 14, 15}

Nas amostras de pimenta malagueta, foram identificados 39 ésteres alifáticos, em sua maioria descritos sensorialmente como compostos possuidores de potentes notas frutais, como por exemplo, o hexanoato de 2-metilpentila, 2,2-dimetilpropanoato de hexila e 3-metilbutanoato de hexila.²⁷ A presença destes

ésteres alifáticos já foi descrita em pimentas habanero mexicanas (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero), e em pimentas piquín provenientes da Colômbia (*Capsicum annuum* L. var *glabrusculum*).^{4, 15} Entretanto, a composição de ésteres encontrada nas amostras de malagueta difere enormemente daquela encontrada em pimentões e em páprica, onde apenas um pequeno número de ésteres foram reportados.^{9, 10, 16, 17, 18}

Comparando-se os resultados dos alcoóis e dos aldeídos presentes nas amostras de pimenta malagueta com aqueles de importância odorífica em pimentões (*Capsicum Annuum* cv. Masurka), apenas os compostos 1-hexanol, (E)-2-hexanol, hexanal e (E)-2-hexanal são comuns a ambas.¹⁷ Entretanto, sabe-se que a real importância dos alcoóis para o aroma dos alimentos quando comparados com os aldeídos é pequena, devido principalmente ao menor limiar de percepção do odor que estes últimos apresentam. Por isso, cabe destacar que dos 15 aldeídos identificados em malagueta, muitos possuem descritores de aroma de verde, pungente ou herbáceo, como é o caso do butanal, hexanal e pentanal; no entanto, também foram encontrados aldeídos como (Z)-2-decenal, mirac aldeído, 2(E)-tridecenal e tetradecanal possuem descritores de aroma floral.^{14, 17, 19, 27}

Quanto aos terpenos, foram encontrados cinco sesquiterpenos e quatro monoterpenos, com destaque para o Δ -3-careno considerado um monoterterpeno importante para o aroma de pimentões.²⁰ Também foram encontrados produtos da degradação de carotenóides como a α -ionona e β -ionona que possuem baixíssimo limiar de percepção e descritores de aroma floral.^{20, 28}

Cabe destacar que não foi identificada a presença de compostos pertencentes à classe das metoxipirazinas nas amostras de malagueta. Os compostos metoxipirazínicos são compostos de baixíssimo limiar de percepção de odor ($0,002 \text{ ng.L}^{-1}$) e são um dos mais importantes compostos do *flavor* de pimentões responsáveis pelo seu característico aroma de “verde”.^{10, 14, 15, 17, 27}

3.2. Voláteis em pimenta dedo-de-moça

A Figura 2 ilustra os cromatogramas obtidos por GC/MS da fração volátil da pimenta dedo-de-moça nos estádios maduro e imaturo, e a Tabela 2, apresenta os resultados da identificação por GC/MS e das áreas dos picos por GC-FID, em dois estádios de maturação e em duas colheitas.

Observando os cromatogramas e os valores de área dos picos obtidos por GC-FID, e considerando que as extrações dos voláteis foram realizadas nas mesmas condições e com a mesma fibra de SPME, percebe-se que com o processo de maturação a maior parte dos compostos voláteis presentes neste tipo de pimenta diminuiu drasticamente ou desapareceu.

No total, foram identificados 50 compostos voláteis para esta amostra, sendo as principais classes químicas encontradas: monoterpenos (34%), aldeídos (18%), sesquiterpenos (14%), ésteres (12%), alcanos (10%), alcoóis (8%), cetonas (2%) e metoxipirazinas (2%).

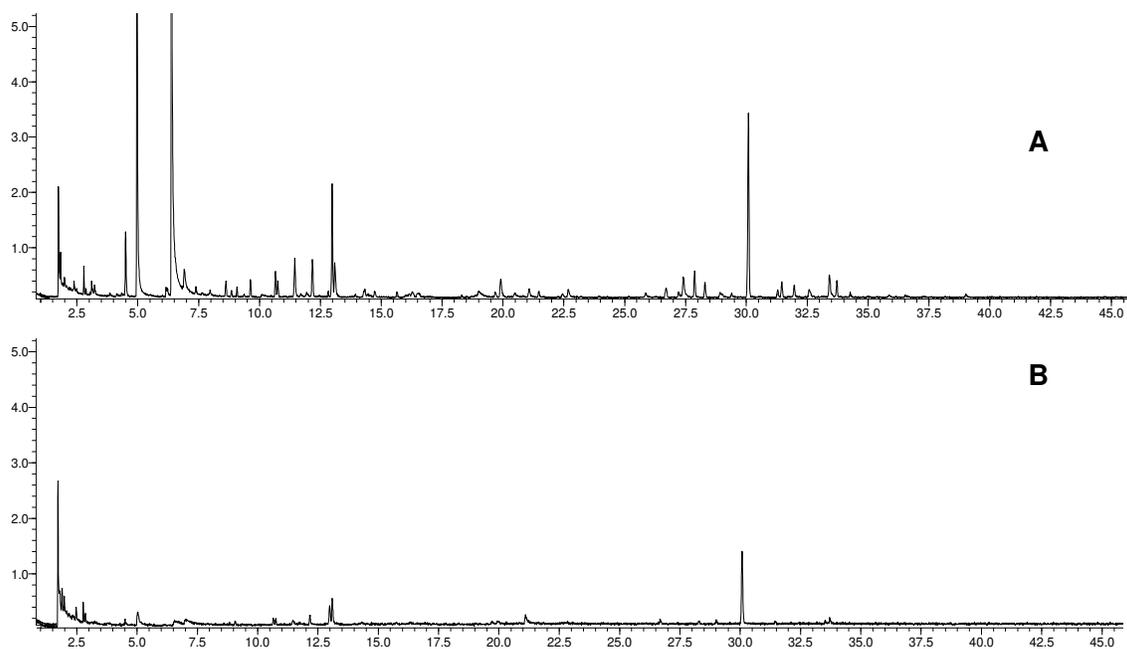


Figura 2. Cromatogramas da fração volátil de pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) por HS-SPME e GC-FID nos estádios de maturação (A) imaturo e (B) maduro.

Diferente do observado para a pimenta malagueta, em dedo-de-moça, foi encontrado um menor número de ésteres, e um maior número de terpenos e sesquiterpenos. Quanto aos aldeídos identificados em dedo de moça, verificou-se a presença de 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, hexanal e nonanal (descritos sensorialmente como frutal, verde, herbáceo e cogumelo)^{17, 27}; compostos estes que já foram descritos como de importância odorífica em pimentões da variedade *Capsicum Annuum* cv. Masurka.¹⁷ Além disso, foi verificada a presença de 2-metoxi-3-isobutilpirazina nas amostras de pimenta dedo-de-moça.

As drásticas diminuições nas áreas dos picos dos compostos identificados ao longo da maturação sugerem que as amostras de pimenta dedo-de-moça

imaturas possuem possivelmente uma maior complexidade de aroma quando comparadas as amostras maduras.

Tabela 2. Compostos voláteis em pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. pendulum) por HS-SPME, GC-FID e GC/MS, em dois estádios de maturação e dois anos distintos.

Composto	LTPRI _{Cal.}	LTPRI _{Lit.}	Δ	2008		2009	
				Imatura*	Madura*	Imatura*	Madura*
Alcanos							
pentano	498	500	2	1,12	0,68	0,87	0,50
isooctano	691	687	-4	0,29	0,32	t	0,14
2-metil-tridecano	1365	1365	0	0,82	-	1,51	-
tetradecano	1401	1400	-1	0,02	-	t	-
pentadecano	1501	1500	-1	1,07	-	1,47	-
Alcoóis							
(2E)-3-metilpenta-2,4-dien-1-ol	843	836	-7	0,36	-	0,40	-
5-hexenol	848	839	-9	31,06	-	35,11	-
hexanol	867	860	-7	0,17	-	0,36	-
Aldeídos							
2-metilpropanal	553	543	-10	1,39	-	0,26	-
butanal	604	607	3	0,55	-	0,38	-
3-metilbutanal	650	643	-7	0,68	0,30	0,80	0,32
2-metilbutanal	661	662	1	0,18	-	0,19	-
pentanal	701	696	-5	0,34	-	0,33	-
3-metil-2-butenal	753	754	1	0,13	-	0,15	-
hexanal	801	806	5	25,63	0,38	29,13	0,28
heptanal	905	901	-4	0,21	-	0,34	-
nonanal	1108	1104	-4	0,26	-	0,30	-
(E)-2-dodecen-1-al	1442	1448	6	0,24	-	0,33	-
Cetonas							
1-penten-3-ona	688	687	-1	0,53	-	0,56	-
Ésteres							
isopentanoato de metila	773	773	0	2,49	-	2,86	-
tiglato de metila	844	841	-3	0,37	-	0,57	-
2-metilbutirato de hexila	1217	1218	1	0,35	0,04	0,29	t
2-metilbutanoato de hexila	1239	1239	0	0,39	-	0,34	-
isovalerato de hexila	1244	1243	-1	0,26	0,12	0,35	0,14
decanoato de alila	1465	1471	6	0,62	-	0,43	-
Monoterpenos							
4-careno	919	919	0	0,54	-	0,69	-

Continuação da Tabela 2

α -pineno	931	935	4	0,34	0,11	0,37	0,12
camfeno	945	950	5	0,54	-	0,76	-
sabineno	971	972	1	1,24	-	1,23	-
β -pineno	973	976	3	0,83	-	0,82	-
β -mirceno	991	987	-4	1,47	-	2,11	-
α -felandreno	1003	1003	0	0,07	-	t	-
α -terpineno	1008	1007	-1	1,91	-	1,69	-
p-cimeno	1023	1025	2	0,23	-	0,32	-
limoneno	1027	1028	1	5,45	0,57	6,17	0,66
eucaliptol	1029	1027	-2	1,60	0,58	2,11	0,59
(E)-sabineno hidrato	1057	1051	-6	0,64	0,04	0,46	t
γ -terpineno	1067	1058	-9	0,02	-	t	-
1,4(8)-p-mentadieno	1087	1086	-1	0,11	-	0,17	-
linalol	1102	1097	-5	0,78	-	0,69	-
(Z)- β -terpineol	1146	1153	7	0,01	-	t	-
4-terpineol	1177	1172	-5	0,10	-	0,03	-
Sesquiterpenos							
patchulano	1291	1293	2	0,18	0,07	t	t
δ -elemeno	1337	1338	1	0,68	-	0,63	-
α -copaeno	1375	1375	0	0,53	0,10	0,94	0,09
β -cariofileno	1418	1418	0	8,23	3,22	11,70	5,27
humuleno	1452	1454	2	0,63	0,12	0,97	0,14
germacreno D	1480	1480	0	0,99	-	0,66	-
cadineno	1523	1528	5	0,34	-	0,88	-
Pirazina							
2-metoxi-3-isobutilpirazina	1182	1181	-1	0,94	0,05	1,27	0,03

*Área dos picos dividida por 10^6 , obtidas por GC-FID (considerando que os fatores de resposta do detector são iguais à unidade), usando coluna capilar de fase estacionária composta por 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano; resultados apresentados como média de triplicatas.

LTPRI_{Calc.} = índices de retenção obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

LTPRI_{Lit.} = índices de retenção da literatura, obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

Δ = diferença entre os índices de retenção da literatura e calculado; LTPRI_{Lit.} - LTPRI_{Calc.}

t = nível traço (área inferior a 0,01).

- = não detectado.

3.3. Voláteis em pimenta murupi

Na figura 3, pode-se observar os cromatogramas obtidos por GC/MS da fração volátil da pimenta murupi nos estádios imaturo e maduro. A observação visual dos cromatogramas mostra que embora tenham ocorrido modificações nos teores dos voláteis segundo o período de maturação, não foram verificadas

mudanças tão drásticas como aquelas que ocorreram com a pimenta dedo-de-moça.

A Tabela 3 apresenta os resultados da identificação dos voláteis da pimenta murupi por GC/MS e das áreas dos seus picos por GC-FID, em dois estádios de maturação e em duas colheitas. No total, foram identificados 79 voláteis pertencentes às seguintes classes químicas: ésteres (36,71%), sesquiterpenos (20,25%), alcoóis (15,19%), aldeídos (11,39%), monoterpenos (11,39%), alcanos (3,80%) e furanos (1,27%). Para as amostras de pimenta murupi, também foi observada uma tendência de diminuição das áreas dos picos dos seus voláteis quando comparados diferentes estádios de maturação.

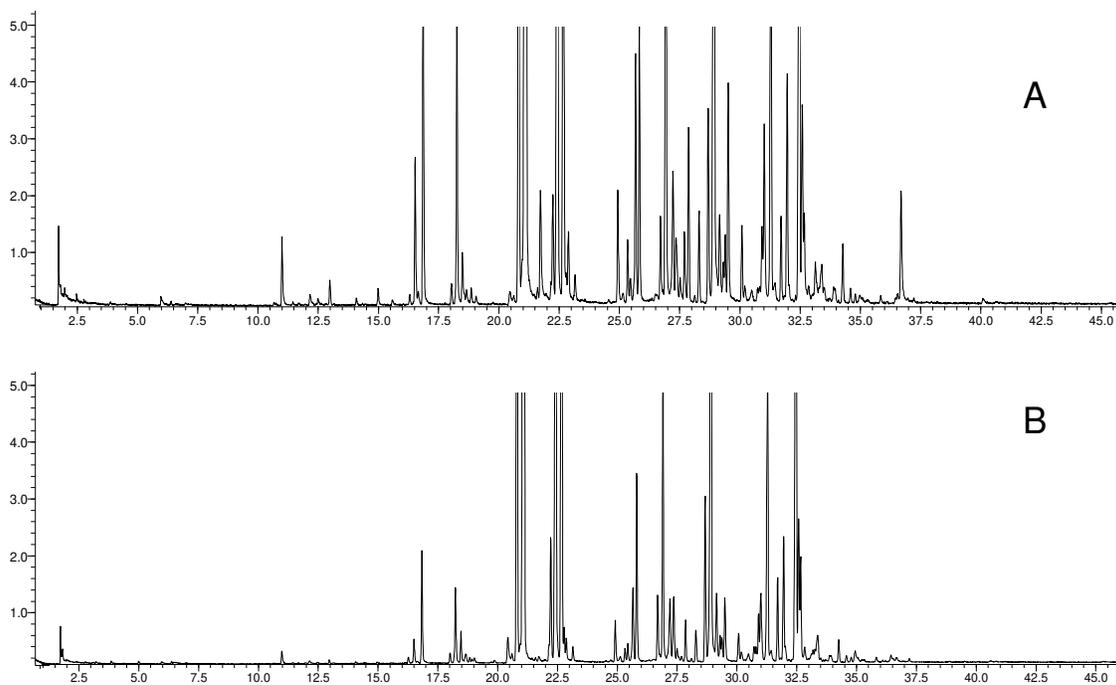


Figura 3. Cromatogramas da fração volátil de pimenta murupi (*Capsicum chinense*) por HS-SPME e GC-FID nos estádios de maturação (A) imaturo e (B) maduro.

Assim como verificado para a pimenta malagueta, a presença de diversos ésteres lineares e ramificados nesta amostra é importante, pois nesta classe química encontram-se compostos com descritores sensoriais de "potentes notas frutais".²⁷ Dessa forma, o maior número de ésteres em pimenta murupi, em comparação com dedo-de-moça pode estar relacionado ao aroma frutal mais agradável da primeira.^{22, 23}

Tabela 3. Compostos voláteis em pimenta murupi (*Capsicum chinense*) por HS-SPME, GC-FID e GC/MS, em dois estádios de maturação e dois anos distintos.

Composto	LTPRI Cal.	LTPRI Lit.	Δ	2008		2009	
				Imatura*	Madura*	Imatura*	Madura*
Alcanos							
6-metil-1-octeno	849	842	-7	0,24	0,13	0,21	0,16
(E)-7-metil-3-octeno	851	860	9	0,50	0,50	0,31	0,31
tetradecano	1407	1400	-7	1,38	3,64	3,95	2,63
Álcoois							
3-metil-1-pentanol	835	826	-9	t	0,22	0,88	0,66
1-hexanol	869	865	-4	t	0,25	0,02	0,14
1-octanol	1059	1057	-2	t	1,32	t	t
4-butoxi-1-butanol	1144	1135	-9	0,73	0,68	t	t
(E,Z)-2,6-nonadien-1-ol	1155	1160	5	9,82	2,41	2,22	1,01
2-decen-1-ol	1260	1266	6	0,87	0,59	1,59	0,89
1-decanol	1278	1272	-6				
10-undecen-1-ol	1339	1346	7	0,33	0,42	0,80	0,94
(E)-2-undecen-1-ol	1362	1355	-7	2,42	2,66	2,59	1,87
2,2-dimetil-1-decanol	1370	1372	2	1,42	10,33	6,94	9,17
(E)-2-dodecenol	1445	1455	10	6,07	6,06	11,16	13,55
(E)-11-tetradecen-1-ol	1660	1664	4	0,30	0,01	0,55	8,83
Aldeídos							
3-metilbutanal	650	643	-7	t	t	0,15	0,19
pentanal	701	707	6	t	t	0,26	0,11
hexanal	802	806	4	t	t	0,51	0,17
(E)-2-hexenal	852	855	3	t	0,13	t	t
(Z)-2-nonenal	1105	1112	7	t	0,16	0,63	0,42
dodecanal	1390	1389	-1	50,14	34,74	26,27	13,47
(Z)-2-dodecenal	1455	1447	-8	47,12	54,23	11,75	5,47
tridecanal	1502	1494	-8	10,19	5,63	2,67	1,79
(E)-2-tridecenal	1553	1546	-7	3,05	6,24	2,93	0,67

Continuação da Tabela 3

Ésteres							
etanoato de hexila	979	984	5	t	1,27	3,09	2,59
pentanoato de ter-butila	1004	999	-5	t	0,69	0,25	0,10
acetate de heptila	1085	1083	-2	t	0,22	t	t
2-metilbutil 2-metilbutanoato	1101	1095	-6	t	0,11	1,04	8,68
3-metilbutirato de 3-metilbutila	1107	1109	2	1,19	2,36	1,53	1,11
3-metilbutanoato de pentila	1111	1118	7	t	t	0,48	0,82
isobutirato de hexila	1114	1118	4	t	3,10	21,25	20,34
acetato de isononila	1150	1151	1	t	8,09	5,20	3,08
butanoato de hexila	1158	1155	-3	t	0,75	1,15	0,85
butirato de (E)-3-hexenila	1191	1192	1	0,25	0,06	t	t
salicilato de metila	1193	1192	-1	t	t	7,35	1,30
butanoato de hexila	1197	1198	1	t	t	2,17	0,43
2,2-dimetilpropanoato de hexila	1202	1197	-5	41,28	46,58	121,02	53,48
hexanoato de 2-metilbutila	1216	1218	2	t	t	1,35	0,20
isovalerato de(Z)-3-hexenila	1234	1238	4	67,60	27,33	24,94	7,22
2-metilbutanoato de (Z)-3-hexenila	1238	1239	1	248,18	160,84	123,60	76,86
2-metilbutanoato de hexila	1248	1243	-5	225,97	176,12	4,16	4,21
3-metilbutanoato de hexila	1249	1243	-6	4,61	2,33	0,29	0,24
isobutirato de heptila	1253	1248	-5	t	t	t	t
acetato de (Z)-6-nonenila	1295	1290	-5	10,63	3,08	8,61	6,17
carbonato de butil 4-metilpentila	1304	1294	-10	1,77	1,77	2,15	3,96
hexanoato de 2-metilpentila	1321	1317	-4	3,79	14,15	35,68	20,50
carbonato de alil heptila	1342	1348	6	17,20	12,88	10,43	5,56
hexanoato de (E)-2-hexenila	1359	1369	10	7,40	5,04	12,55	6,63
pivalato de octila	1405	1396	-9	7,32	4,58	183,50	168,65
pentanoato de octila	1416	1417	1	21,95	16,32	9,92	13,76
isopentanoato de octila	1448	1441	-7	23,60	14,32	60,17	35,24
decanoato de alila	1472	1471	-1	17,56	38,36	0,58	0,77
Furano							
2-pentil-furano	991	993	2	t	t	0,29	0,23
Monoterpenos							
α -pineno	932	935	3	5,39	0,71	t	t
sabineno	973	972	-1	9,32	1,32	0,10	0,17
β -pineno	975	976	1	8,32	1,33	t	t
β -miceno	993	987	-6	2,69	1,48	t	t
α -felandreno	1005	1002	-3	2,58	1,22	t	t
δ 3-careno	1010	1014	4	8,91	1,97	t	t
limoneno	1027	1028	1	1,54	1,62	1,34	1,51
(E)-beta-ocimeno	1051	1046	-5	3,05	2,33	t	0,31
neral	1223	1220	-3	0,50	0,02	1,47	10,03
Sesquiterpenos							
α -cubebeno	1355	1349	-6	18,42	13,73	14,61	10,13
α -ylangeno	1376	1375	-1	0,64	0,40	0,37	0,19
α -copaeno	1381	1375	-6	6,63	7,34	5,44	5,43
β -cariofileno	1424	1428	4	4,86	2,56	5,50	5,68
(E)-beta-farneseno	1435	1440	5	1,67	1,39	1,22	0,70
α -humuleno	1460	1454	-6	1,29	1,40	0,46	0,31

Continuação da Tabela 3

(E)- β -bergamoteno	1465	1467	2	13,16	9,36	22,44	14,32
α -cloveno	1474	1468	-6	2,58	1,71	0,15	0,28
α -guaiano	1486	1490	4	159,36	121,30	122,34	71,87
epizonareno	1488	1494	6	17,68	15,16	23,09	14,32
valenceno	1490	1491	1	6,17	4,16	14,53	6,40
β -himachaleno	1507	1503	-4	5,99	8,06	5,64	3,74
β -sesquifelandreno	1521	1525	4	0,56	0,64	t	t
zonareno	1523	1527	4	1,19	1,68	1,80	1,87
ω -cadineno	1531	1526	-5	2,88	3,52	3,56	4,03
(E)-cadina-1,4-dieno	1540	1536	-4	1,14	1,14	1,07	0,88

*Área dos picos dividida por 10^6 , obtidas por GC-FID (considerando que os fatores de resposta do detector são iguais à unidade), usando coluna capilar de fase estacionária composta por 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano; resultados apresentados como média de triplicatas.

LTPRI_{Calc.} = índices de retenção obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

LTPRI_{Lit.} = índices de retenção da literatura, obtidos em coluna capilar de 5% fenil/95% dimetilpolisiloxano.

Δ = diferença entre os índices de retenção da literatura e calculado; LTPRI_{Lit.} - LTPRI_{Calc.}

t= nível traço (área inferior a 0,01).

- = não detectado.

Destaca-se também a presença da lactona 2-pentil-furano, não encontrada em malagueta e dedo-de-moça. Este composto, que também possui baixo limiar de percepção e aroma com notas de “amanteigado” e “óleo de anis”²⁴, foi encontrado com maiores valores de áreas no segundo ano de colheita.

Outro fato notório é que não foram identificadas cetonas nas amostras de pimenta murupi. Cetonas de cadeia curta (C₅-C₁₁) são potentes moléculas de *flavor*, em especial as metilcetonas que são consideradas precursoras de alguns dos alcoóis secundários do aroma de frutos.²⁵

Dentre os terpenos presentes nas amostras de pimenta murupi, foi identificada a presença dos compostos Δ -3-careno e neral. O primeiro foi também encontrado em malagueta, e o segundo apenas em murupi. O neral é capaz de conferir agradáveis notas cítricas, mesmo em pequenas concentrações, estando provavelmente relacionado ao *flavor* nesse tipo de pimenta.²⁶

4. CONCLUSÕES

Com a presente pesquisa foi possível identificar 83 compostos voláteis em pimenta malagueta, em sua maioria ésteres alifáticos e alcoóis; 50 compostos voláteis em pimenta dedo-de-moça, em sua maioria monoterpenos e sesquiterpenos; e 79 voláteis em pimenta murupi, em sua maioria ésteres alifáticos e sesquiterpenos. Foram verificadas diminuições nas áreas dos picos dos voláteis quando comparados os diferentes estádios de maturação para cada uma das pimentas investigadas, sendo que na pimenta dedo-de-moça, a maioria os voláteis desapareceram com o amadurecimento.

5. REFERÊNCIAS

1. Pruthi, J. S. *Spices and condiments*. In Chichester, E. M. & Stewart, G. F. (Eds.). **1980**. New York: Academic Press.
2. Sousa, E.T.; Rodrigues, F.M.; Martinsa, C.C.; et al. *J.B. Microchem. J.* **2006**, 82, 142-149.
3. Reifschneider, F. J. B. (Org.) *Capsicum - pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, **2000**.
4. Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; et al. *Food Chem.* **2007**, 104, 1682-1686.
5. Cichewicz, R.H. & Thorpe, P.A.; *J. Ethnopharmacol.* **1996**, 52, 61.
6. Molina-Torres, J.; Garcia-Chávez, A.; Ramirez-Chávez, E.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, 64, 241.
7. Otero, R.; Nunez, V.; Barona, J.; et al. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 73, 233.

8. EMBRAPA. *II Encontro Nacional do Agronegócio Pimentas (Capsicum spp.) e II Mostra Nacional de Pimentas e Produtos Derivados*. Brasília - DF. **2005**.
9. van Ruth, S.; Boscainib, E.; Mayr, D.; et al. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223–224, 55–65.
10. Mazida, M.M.; Salleh, M. M. and Osmanet, H. *J. Food Compos Anal.* **2005**, 18 427–437.
11. Parreira, F.V.; Cardeal, Z.L. *Quim. Nova.* **2005**, 28, 646.
12. Adams, RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA, **2007**.
13. Nongonierma, A.; Cayot P.; Le Queacutereacute, J.L.; et al. *Food Reviews International*, **2006**, 22, 51 – 94.
14. Pino, J.; Sauri-Duchb, E. and Marbot, R. *Food Chem.* **2006**, 94, 394–398.
15. Forero, M. D.; Quijano, C.E. and Pino, J.A. *Flavour Fragr. J.* **2009**, 24, 25–30.
16. Cremer, D. R., & Eichner, K. *J. Agric. Food Chem*, **2000**, 48, 2454-2460.
17. Luning, P.A.; de Rijk, T.; Wichers, H.J.; et al. *J. Agrlc. Food Chem.* **1994**, 42, 977-983.
18. Kim, I.-K.; El-Aty, A.M.A.; et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 45, 487-494.
19. Chitwood, R. L., Pangborn, R. M., and Jennings, W. *Food Chem.* **1983**, 11, 201-216.
20. Schwab, W. & Roscher, R. *Recent Res. Dev. Phytochem.* **1997**, 1,643–673.
21. Wu, C.M & Liou, S.E. Effect of Tissue Disruption on Volatile Constituents of Bell Peppers.*J. Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 770-772.

22. Flament, I.; *Coffee Flavor Chemistry*; British Library Cataloguing in Publish Data: London, **2002**.
23. Moya-Léon, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C. et al. *Postharvest Biology and Technology*, **2006**, 42, 185-197.
24. Bandeira, R. D. C. C.; Toci, A.T.; Trugo, L. et al. *Quím. Nova*. **2009**, 32, 309-314.
25. Strohalm, H., Dregus, M., Wahl, et al. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 10339 - 10344.
26. Perez-Cacho, P.R. & Rouseff, R.L. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, 48, 681-695.
27. The Pherobase, em www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php, acessado em 08 de janeiro de 2010.
28. Flavournet and human odor space, em: http://www.flavornet.org/f_kovats.html acessado em 08 de janeiro de 2010.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DE PIMENTAS *CAPSICUM* DO BRASIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE/ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR TEMPO DE VOO (GCXGC/TOFMS)

Stanislau Bogusz Junior¹, Helena Teixeira Godoy¹

Artigo segundo as normas de publicação 2009 da revista Química Nova.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6121. Campinas – SP. Brasil.

ABSTRACT

COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY (GCXGC/TOFMS) ANALYSIS OF VOLATILES TO BRAZILIAN *CAPSICUM*: Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) coupled to the detector flame ionization (FID) and mass spectrometry time of flight (TOFMS) was developed to characterization of volatile fractions extracted by headspace solid-phase microextraction (HS - SPME), of three Brazilian varieties of *Capsicum* peppers: malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. pendulum) and murupi (*Capsicum chinense*). Considering all samples, 220 compounds were identified, 24 of which showed potential for discrimination of the samples and were used in principal component analysis (PCA). The results of PCA show variability among samples and also according to their maturation stages. Malagueta was characterized by branched esters, murupi by sesquiterpenes and dedo-de-moça by the presence of aldehydes and methoxypyrazine.

Keywords: GC × GC/TOFMS, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum* var. pendulum, *Capsicum chinense*, volatile compounds, principal component analysis.

1. INTRODUÇÃO

Pimentas do gênero *Capsicum* são especiarias muito populares em diversas partes do mundo, sendo utilizadas principalmente pelos seus atributos de cor, pungência e aroma.^{1,2} Podem ser consumidas frescas, secas, em conservas ou na forma de molhos de pimenta. Industrialmente, são utilizadas como agentes colorantes e flavorizantes em diversos tipos de alimentos.^{3,4}

Dependendo do grau de maturação em que as pimentas se encontram, podem ser percebidas diferenças no seu aroma como consequência dos processos bioquímicos que ocorrem com a maturação.⁵ Em função disso, diversos trabalhos se ocuparam da investigação dos voláteis em frutos de *Capsicum* com o objetivo de conhecer quais compostos estão presentes nas diferentes variedades e também para verificar como a maturação, o processamento industrial e as injúrias nos tecidos dos frutos poderiam afetar a composição de seus voláteis.^{5,6,7,8} Nestas pesquisas, métodos como extração e destilação simultâneas (SDE, “*Simultaneous Steam Distillation-Solvent Extraction*”), trapeamento do ar entre a amostra e o frasco fechado (“*Purge and Trap*”) e microextração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) têm sido utilizados como métodos de extração; porém, independente da extração utilizada, a cromatografia gasosa (GC, “*Gas Chromatography*”), acoplada à espectrometria de massas (MS, “*Mass Spectrometry*”) é a metodologia instrumental padrão nestas investigações.^{6,7,9,10,11}

O aperfeiçoamento da GC convencional com o uso de colunas capilares e de sistemas cromatográficos, que permitem o uso de altas temperaturas e vazões do gás de arraste, em muito aumentou a eficiência das análises. Entretanto, dada

a complexidade da fração volátil presente numa amostra de pimenta, é comum a existência de picos não identificados nos cromatogramas, pois até mesmo os modernos sistemas de GC podem ser insuficientes para a separação individual de todos os constituintes voláteis presentes numa amostra. Tal afirmação é sustentada pela teoria estatística de sobreposição (*statistical theory of overlap - STO*) de Davis & Giddings ¹², segundo esta, para resolvermos 80% dos compostos de uma amostra que contenha 100 componentes, seriam necessários 2,4 milhões de pratos teóricos, o que equivale a uma coluna cromatográfica capilar de 500m de comprimento e diâmetro interno de 0,25mm. O emprego de tais colunas tornaria as corridas cromatográficas excessivamente longas (com mais de 10 horas de análise), o que seria inviável para a maioria dos laboratórios. Como solução para tal problema, uma das vertentes mais promissoras é aquela que se baseia em um conceito já há muito conhecido: o de separação multidimensional. A análise multidimensional em cromatografia pode ser considerada como qualquer técnica que combine duas ou mais separações distintas, ou etapas analíticas, em que pelo menos um dos seus passos envolva uma separação cromatográfica. ¹³

Desta forma, uma parte suficientemente representativa do eluato que sai da primeira coluna (primeira dimensão ou 1-D) deve ser introduzida em uma segunda coluna (segunda dimensão ou 2-D) mantendo-se as características de separação ocorridas na 1-D. Assim, técnicas como a cromatografia líquida acoplada à cromatografia líquida (LC-LC, "*Liquid Chromatography-Liquid Chromatography*"), e a cromatografia gasosa acoplada à cromatografia gasosa (GC-GC, "*Gas Chromatography-Gas Chromatography*"), são consideradas multidimensionais. ¹⁴

A desvantagem destas técnicas é que apenas pequenas porções ou fatias da 1-D

sofrem o processo de separação multidimensional, e desta forma a técnica não é abrangente.¹⁵

Entretanto, em 1991 Liu e Phillips¹⁷ introduziram a abordagem multidimensional à GC sob o nome de cromatografia bidimensional abrangente (GCxGC, “*Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*”). Um método cromatográfico é considerado multidimensional abrangente quando (a) todas as partes da amostra são submetidas a duas separações distintas; (b) percentagens iguais de todos os componentes da amostra (100% ou menos) devem passar pelas colunas do sistema e chegar ao detector, e (c) a separação obtida na dimensão anterior (resolução) deve ser essencialmente mantida.¹⁴ Além disso, embora existam controvérsias, alguns autores sustentam que tais processos de separação devem ser ortogonais ou quase-ortogonais, isto é, os mecanismos de retenção de cada coluna devem ser independentes (por exemplo, ponto de ebulição na primeira coluna e polaridade na segunda).¹⁶

A GCxGC é caracterizada pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas, uma coluna capilar convencional e a outra curta (do tipo usada para cromatografia gasosa rápida “*Fast GC*”), de modo que todo o efluente da primeira, ou uma parte representativa do mesmo, é conduzido para a segunda através de um modulador. Esse é considerado o coração do processo multidimensional abrangente, pois tem a função de acumular continuamente pequenas frações adjacentes do eluente da 1-D (sob a forma de bandas estreitas), focalizar as frações acumuladas no tempo e no espaço, e liberar essas frações coletadas como pulsos estreitos para a 2-D em períodos de tempo muito curtos. Com este processo, os picos cromatográficos da 1-D são literalmente fatiados, e

ao entrarem na segunda coluna (do tipo *Fast GC*) são separados de forma muito rápida, sem um aumento significativo do tempo de análise quando comparado a cromatografia gasosa convencional (1-D GC). A grande vantagem da GCxGC frente a GC-GC ou a 1-D GC é a grande capacidade de pico da técnica, ou seja, o número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise.¹⁴ Além disso, a GCxGC é capaz de incrementar os limites de detecção e quantificação, pois os picos modulados que eluem da coluna na 2-D em GCxGC são 10 a 50 vezes mais estreitos que os obtidos por 1-D GC.¹⁸

Uma vez que a GCxGC gera picos rápidos devido principalmente a natureza da coluna da segunda dimensão (picos com largura de base de cerca de 50ms), são necessários detectores extremamente rápidos para os medir com precisão. O detector de ionização em chama (FID, *Flame Ionization detector*) além de ser um detector de baixo custo, apresenta uma taxa de aquisição de dados de até 200Hz, o que o torna suficientemente rápido para os picos da segunda coluna de um sistema GCxGC, podendo ser utilizado para otimização das condições de análise, para quantificações, e para algumas identificações baseadas na estrutura química dos compostos e sua retenção no espaço de separação bidimensional. Além deste, os detectores de massa por tempo de voo (TOF/MS, "*Time of Flight Mass Spectrometry*") são atualmente os únicos detectores de massas com frequência de aquisição de sinal suficientemente alta (200Hz) para serem acoplados ao sistema GCxGC sem a ocorrência de perdas de sinal.¹⁹

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia por GCxGC para caracterização da fração volátil de três variedades de pimentas *Capsicum* brasileiras: pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça

(*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*), por microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME), a fim de identificar os compostos característicos de cada variedade, e avaliar os compostos voláteis que podem discriminar estas amostras segundo seus estádios de maturação, com o auxílio de técnicas estatísticas multivariadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras: as amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi (cerca de 2 kg de cada espécie) foram obtidas junto ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) na cidade de Campinas, São Paulo - Brasil. Os genótipos selecionados para o estudo foram obtidos do banco de germoplasma do setor de Hortaliças do IAC - Campinas. As plantas foram cultivadas sob tratamentos similares de fertilizantes e irrigação, no período de janeiro a maio de 2009. A identificação botânica das plantas foi realizada pela Dr^a. Arlete Marchi Tavares de Melo, pesquisadora do IAC - Campinas. As amostras de pimenta foram coletadas em dois estádios de maturação: fisiológica (desenvolvimento máximo em tamanho, porém ainda imaturas) e comercial (desenvolvimento completo em tamanho e cor). Estas foram colhidas pela parte da manhã, e imediatamente transportadas para o laboratório para as análises.

2.2. Preparo das amostras: para a extração dos voláteis, empregou-se HS-SPME como segue: alíquotas de 100 g de frutos inteiros de pimenta foram triturados em liquidificador, após, pesou-se 1,00 g da amostra triturada em frascos para SPME de 15,0 mL dotados de tampa rosqueada e septo de PTFE/silicone (Supelco -

Bellefonte, PA, USA). A fibra de SPME utilizada neste estudo foi uma divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30 μ m, (DVB/CAR/PDMS), nº 57328, obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Esta foi devidamente condicionada antes do uso, segundo as recomendações do fabricante. Os voláteis foram extraídos sob as seguintes condições: temperatura de extração 40 °C, tempo de equilíbrio 15 min e tempo de extração 80 min. Depois da extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos a uma temperatura de 250 °C em modo de divisão (“*split*”) 1:20. Além disso, ao fim de cada procedimento de extração e dessorção, realizou-se o condicionamento da fibra por 15 min a 250 °C, segundo a recomendação do fabricante. Tal procedimento foi realizado para garantir a inexistência de picos nos brancos de corrida e para garantir a boa qualidade dos procedimentos de extração por SPME. Todas as amostras foram injetadas em triplicata e os resultados apresentados neste trabalho são suas médias.

2.3. GCxGC-FID: As análises cromatográficas bidimensionais foram realizadas no Núcleo Multi-usuário de Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC x GC), do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para as análises dos voláteis das pimentas, inicialmente foi utilizado um sistema de cromatografia bidimensional abrangente acoplado ao detector de ionização em chama (GCxGC-FID), buscando-se as melhores condições cromatográficas e de injeção, o jogo de colunas apropriado e melhor período de modulação para as análises. Para isso, foi utilizado um cromatógrafo GCxGC-FID HP6890 (Agilent Technology, USA) dotado de um modulador criogênico da

LECO (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Os dados adquiridos pelo equipamento foram tratados no Software Chroma TOF versão 3.XX. Para as separações cromatográficas foram testados os jogos de colunas capilares listados na Tabela 1.

Tabela 1. Jogos de coluna testados no sistema de GCxGC –FID.

Jogo	Fase	1D – dimensão	Fase	2D – dimensão
1	DB5	30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m	DB-WAX	2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1 μ m
2	DB5	30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m	DB-17	2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1 μ m
3	DB5	30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m	RTL350	2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1 μ m
4	DB-WAX	30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m	DB-17	2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1 μ m
5	DB-WAX	30m x 0,25mm d.i. x 0,25 μ m	DB1	1,1m x 0,15mm d.i. x 0,1 μ m

DB5 – (5%-fenil)-metilpolisiloxano; DB1 – 100% dimetilpolisiloxano; DB-17 – (50%-fenil)-metilpolisiloxano; DB-WAX – polietileno glicol (PEG); RTL350 – líquido cristalino seletivo para compostos aromáticos.

Os parâmetros operacionais utilizados no GCxGC-FID estão descritos a seguir. Injetor a 250 °C, onde foram testadas as seguintes razões de divisão da amostra (“*split*”): 1:10, 1:20, 1:30 e 1:50. As rampas de temperatura no forno primário e secundário foram estabelecidas com base nas condições de análise prévia em GC 1-D: 40 °C (0,2 min), com incremento de 3 °C.min⁻¹ até 230 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min; e para o forno secundário empregou-se: 45 °C (0,2min), com incremento de 3 °C.min⁻¹. até 235 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio em fluxo constante de 1,0mL.min⁻¹; e o detector foi operado a 250 °C. Além disso, foram otimizados os períodos de modulação de: 3, 4, 5, 6 e 8 segundos.

2.4. GCxGC/TOFMS: Uma vez que as condições de análise foram estabelecidas para o GCxGC-FID, estas foram transferidas, com pequenas adaptações, para um

GCxGC/TOFMS, Pegasus IV da LECO (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA), equipado com um modulador criogênico, conforme mostrado na Figura 1.

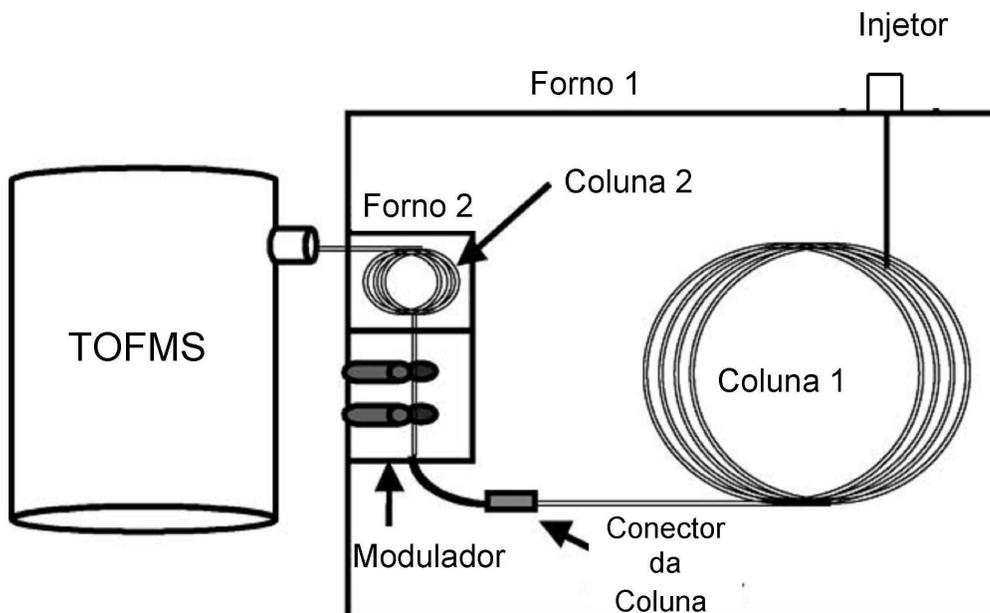


Figura 1. Desenho esquemático do GCxGC/TOFMS. Adaptado de Pierce et al. 2006.²⁰

Os parâmetros operacionais utilizados no GCxGC/TOFMS foram os seguintes: injetor em temperatura de 250 °C, operando sob modo de divisão da amostra (“split”) 1:20, e fluxo de 20mL.min⁻¹; colunas cromatográficas: DB-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm de fase estacionária) e DB-WAX (2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1µm de fase estacionária); rampa de temperatura no forno primário: 40 °C (0,2 min), com incremento de 3 °C.min⁻¹ até 230 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min; forno secundário: 45 (0,2min), com incremento de 3 °C.min⁻¹ até 235 °C, permanecendo nesta temperatura por 4 min; gás de arraste hélio em fluxo constante de 1,3mL.min⁻¹; período de modulação: 6s; interface a 240 °C; fonte de ionização por elétrons a 200 °C e a +70 eV; detector: 100 Hz, monitorando a faixa

de massas de 40-400m/z e voltagem da placa de multicanais 1,7 kV. Os dados adquiridos pelo equipamento foram tratados no Software Chroma TOF versão 3.XX.

Para a identificação tentativa dos compostos voláteis presentes nas amostras de *Capsicum* foram levados em consideração os seguintes critérios: similaridade superior a 80%, em relação à comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles das bibliotecas mainlib e replib do “*National Institute of Standards and Technology*” (NIST 08), que acompanham o software do Chroma TOF versão 3.XX, onde similaridade igual a 100% indica espectros de massas idênticos; e comparação dos índices de retenção com programação linear de temperatura experimentais obtidos com aqueles da literatura. Para este fim, uma série de hidrocarbonetos alifáticos (C₆-C₂₀) foi injetada sob as condições de análise a fim de se obter os índices de retenção de Van den Dool e Kratz²¹ (LTPRI – *linear temperature programmed retention index*) conforme a equação abaixo:

$$LTPRI = \frac{(t_R - t_{Rn}) \times 100}{t_{Rm} - t_{Rn}} + 100n$$

Em que: t_R – tempo de retenção do composto; t_{Rn} – tempo de retenção do alcano linear menos retido que o composto; t_{Rm} – tempo de retenção do alcano linear mais retido que o composto; n – número de carbonos do alcano linear menos retido que o composto.

2.5. Análise estatística: os resultados geraram uma matriz de dados com um total de 6 amostras versus 220 compostos voláteis (variáveis). Por motivos descritos no tópico resultados e discussão, esta matriz de dados sofreu uma

seleção de variáveis com redução para 6 amostras versus 24 voláteis que foi analisada por uma técnica de análise multivariada, a análise de componentes principais, através do programa Statistica versão 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento de método cromatográfico por GCxGC-FID

Para o desenvolvimento do método bidimensional abrangente, primeiramente foi utilizado o sistema GCxGC-FID a fim de se estabelecer as condições cromatográficas, o jogo de colunas e o período de modulação mais adequados para a análise dos voláteis. Nesta etapa, utilizaram-se amostras de pimenta malagueta imatura. Apesar do objetivo principal deste trabalho se tratar de uma caracterização, houve necessidade de se trabalhar com injeção em modo *split*, uma vez que o uso de coluna capilar do tipo *Fast-GC* (0,1µm de fase estacionária) na 2-D resultava em sobrecarga da capacidade desta coluna quando se operava em modo *splitless*. Das razões de *split* testadas, a de 1:20 foi a mais efetiva, pois esta foi a menor das razões capaz de evitar a sobrecarga da capacidade da segunda coluna sem diminuir significativamente o número de picos no cromatograma.

Após estes ajustes, no sistema de injeção foram testados cinco jogos de coluna listados da Tabela 1. As colunas DB-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm de fase estacionária) e DB-WAX (2,60m x 0,1mm d.i. x 0,1µm de fase estacionária) foram as que apresentaram a melhor capacidade de resolução para os voláteis da pimenta malagueta, sendo então utilizadas para a escolha do período de modulação. Acredita-se que a melhor eficiência obtida com este jogo de colunas

deva-se, em grande parte, a boa separação obtida com o uso da coluna DB-5 em trabalhos prévios com estas amostras. Uma vez que, um sistema bidimensional é mais efetivo quão melhor for a separação cromatográfica na primeira dimensão, pois na 2-D ocorre a separação daqueles compostos que não foram efetivamente resolvidos na 1-D. Além disso, as diferentes composições de fase estacionária destas colunas estão relacionados à sua ortogonalidade; ou seja, aos mecanismos de retenção independentes de cada coluna. No caso das colunas que apresentaram melhor desempenho, temos na 1-D a predominância de mecanismos relacionados principalmente ao ponto de ebulição dos analitos, enquanto que na 2-D ocorrem predominantemente mecanismos de separação por polaridade.

Após, testou-se diferentes períodos de modulação com a finalidade de se obter um melhor espaço de separação com um menor número de picos fora de ciclo nos cromatogramas. Dos períodos de modulação testados o de 6s foi o que apresentou os melhores resultados. O período de modulação corresponde ao tempo de um ciclo completo de modulação, ou seja, é igual ao tempo entre duas injeções sucessivas na segunda dimensão. Enquanto que um pico fora de ciclo corresponde ao efeito observado quando um determinado composto apresenta um tempo de permanência na segunda coluna superior ao período de modulação.¹⁴

3.2. Análises dos voláteis de pimentas *Capsicum* por GCxGC/TOFMS

Uma vez que os parâmetros operacionais do sistema GCxGC-FID foram estabelecidos, estes foram transferidos para o GCxGC/TOFMS, no qual realizou-se as análises para a identificação dos voláteis das pimentas. A Figura 2 ilustra os

cromatogramas do GCxGC-FID e do GCxGC/TOFMS para a amostra de pimenta malagueta imatura, com destaque para as principais classes químicas desta amostra. Nota-se que estas classes encontram-se agrupadas ou estruturadas em determinadas regiões. Estas estruturas são o resultado do ordenamento entre os compostos pertencentes a uma mesma classe química num mesmo espaço de separação cromatográfica.^{14, 19} A importância de tais estruturas é a possibilidade da aplicação de um mesmo método cromatográfico a outras amostras similares, uma vez que para estas amostras similares, compostos pertencentes a uma determinada classe química tenderão a manter suas posições nestas estruturas. Tal fato, permite que após uma prévia identificação em um detector de massas, e com o estabelecimento das estruturas, pode-se empregar apenas o GCxGC-FID para identificações de classes químicas ou de compostos químicos em outros tipos de amostras, pois as estruturas são uma impressão digital (“*finger print*”) dos componentes químicos cromatografados no espaço de separação.²⁰

Além disso, dentro de uma mesma classe química pode ser observado o efeito telhado (“*Roof-tile effect*”), que consiste em um perfil relativo ao agrupamento dos picos de uma classe química de compostos relacionados no espaço de separação. Este espaço se repete quando o número de carbonos destes compostos aumenta ou diminui, de forma a causar uma impressão visual de telhado no cromatograma bidimensional, sendo que cada conjunto alinhado de “telhas” corresponde a um grupo de compostos pertencentes a uma classe química que apresenta um determinado número de carbonos.^{14, 22} O efeito

telhado também auxilia na identificação de compostos e, a título de exemplo pode se observar na Figura 3 este efeito para os compostos da região dos ésteres.

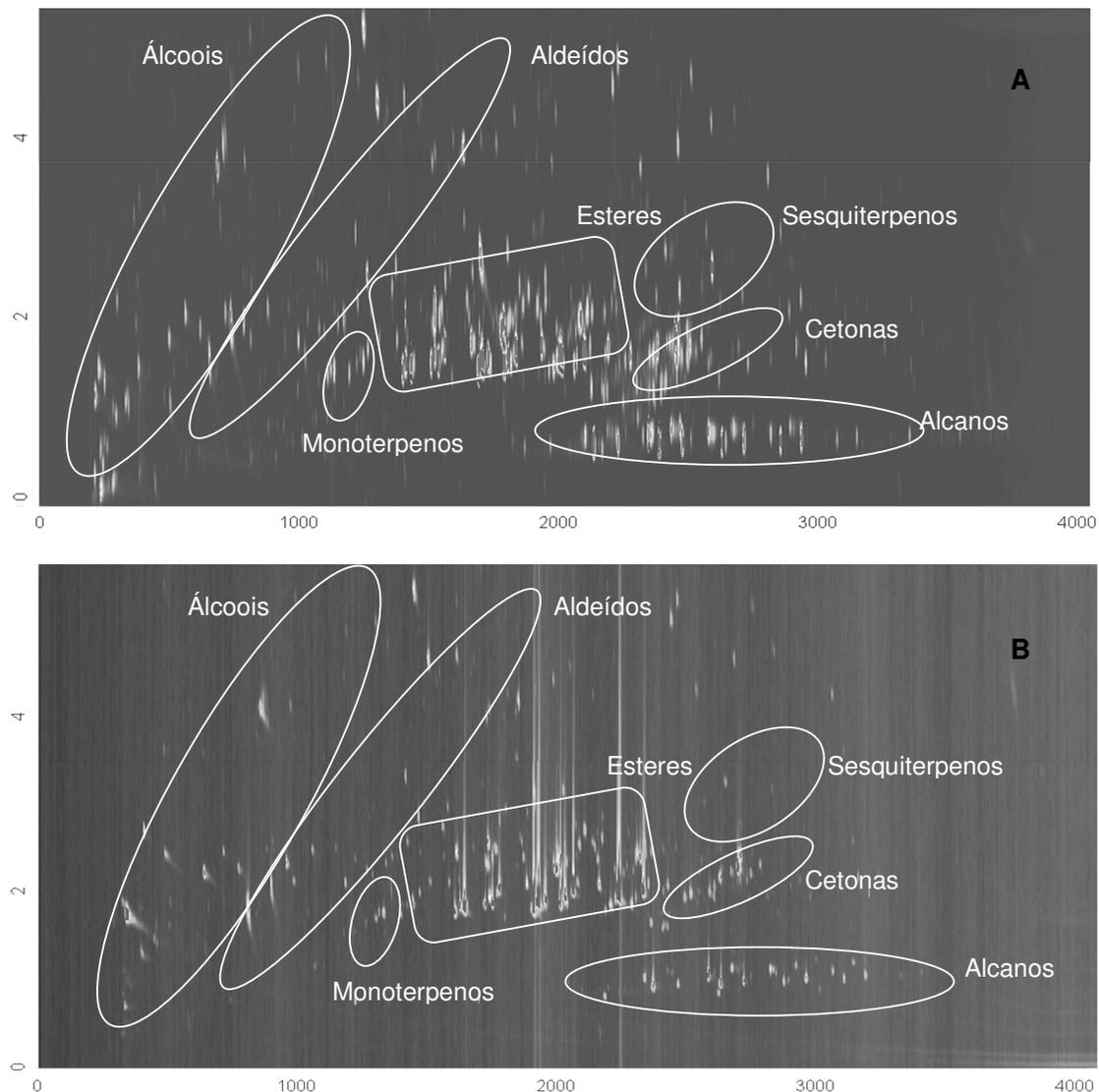


Figura 2. Cromatogramas dos compostos voláteis de pimenta malagueta imatura por HS-SPME e (A) GCxGC-FID e (B) GCxGC/TOFMS, com as respectivas estruturações das principais classes químicas presentes.

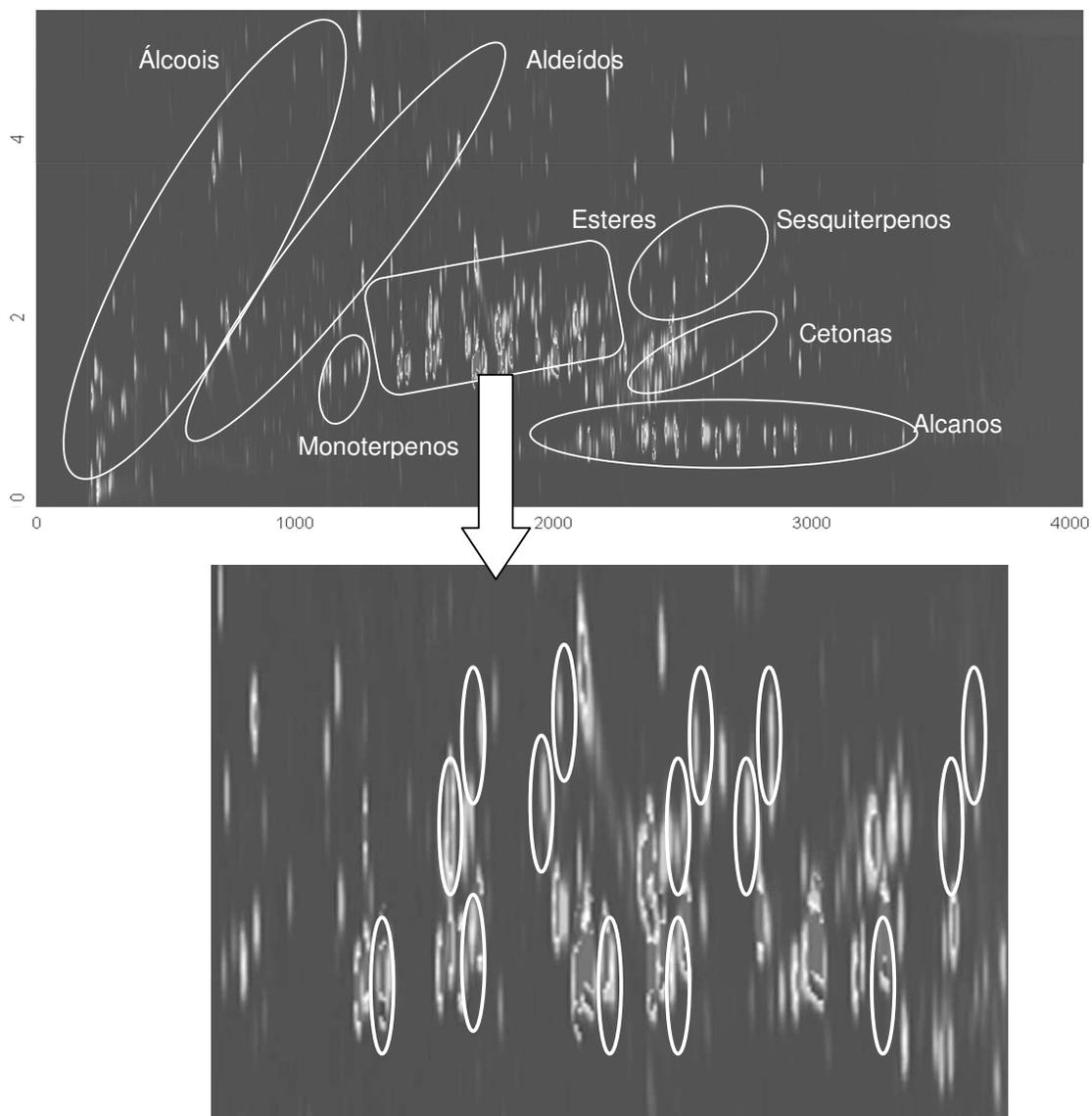


Figura 3. Ampliação da região de ésteres da pimenta malagueta imatura ilustrando o efeito telhado observado para alguns destes compostos.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados da identificação dos compostos voláteis das pimentas malagueta, murupi e dedo-de moça, em dois estádios de maturação por HS-SPME, e GCxGC/TOFMS. As identificações tentativas foram realizadas comparando-se os espectros de massa obtidos para as amostras com os espectros de massa da literatura (NIST 08), com similaridade de ao menos

80% e por comparação dos LTPR calculados (LTPR_{cal.}) com aqueles da literatura (LTPR_{lit.}), admitindo-se uma variação máxima nestes índices de ± 30 . Esta variação foi considerada devido ao fato de que as bibliotecas de índices de retenção existentes na literatura foram construídas em sistemas monodimensionais, e estes nem sempre possuem correspondência em GCxGC. A falta de correspondência entre os índices de retenção para monodimensional e bidimensional deve-se a fatores como o uso de colunas com diferentes mecanismos de separação (diferentes seletividades) e dimensões distintas (as colunas de *Fast GC* na 2-D provocam grandes diferenças na velocidade linear do gás de arraste nesta dimensão), além do emprego de temperaturas diferentes nos fornos primário e secundário. Entretanto, quando se correlaciona os LTPR_{cal.} com os LTPR_{lit.} verificou-se que existe uma relação linear entre estes.¹⁹ A Figura 4 apresenta um gráfico que correlaciona estes valores, apresentando a equação da reta e seu coeficiente de correlação (r)

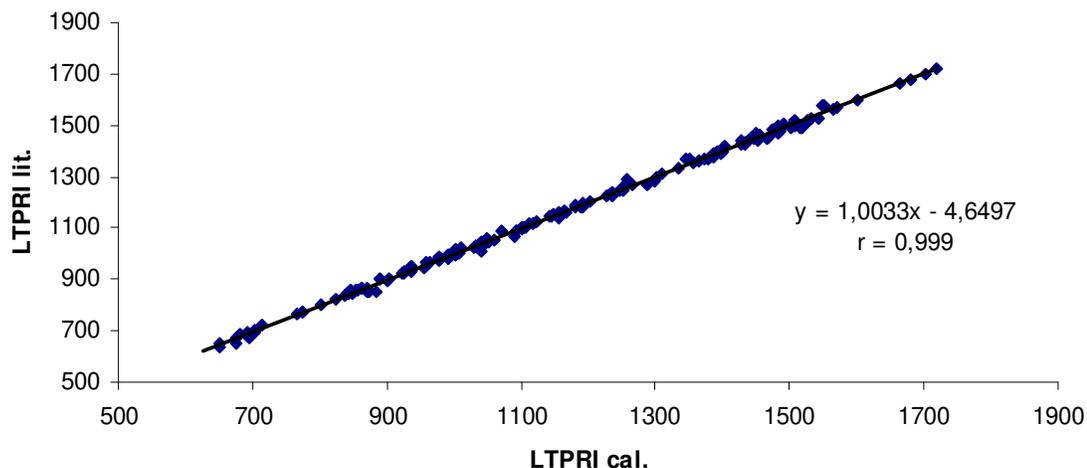


Figura 4. Correlação entre os LTPR_{cal.}, obtidos experimentalmente por GCxGC/TOFMS, e os de referência LTPR_{lit.}

Considerando-se todas as amostras analisadas, foram identificados 220 voláteis agrupados segundo as seguintes classes químicas: alcanos (33), alcoóis (23), aldeídos (16), cetonas (10), ésteres (81), furanos (3), monoterpenos (14), sesquiterpenos (38), pirazinas e sulfurados (1). As diferentes pimentas analisadas apresentaram alguns compostos característicos e estão destacados na Tabela 1 com letras em sobrescrito. Tal fato sugere que possivelmente estes compostos característicos estejam relacionados às diferenças existentes no *flavor* destas pimentas.

No total, na pimenta malagueta foram identificados 125 compostos voláteis, sendo que 53 destes foram encontrados apenas nesta amostra, estes voláteis característicos constituíam-se principalmente de ésteres (um total de 17) e de alcoóis (11). Já na pimenta murupi foram identificados, no total, 123 voláteis, sendo que 56 destes foram encontrados apenas nesta amostra, estes voláteis característicos constituíam-se principalmente de terpenos (24) e de ésteres (17), enquanto que na pimenta dedo-de-moça foram identificados no total 75 compostos voláteis, sendo que 31 destes foram encontrados apenas nesta amostra, estes voláteis característicos constituíam-se principalmente de terpenos (9) e de aldeídos (8).

Além disso, foram identificados 76 compostos que eram comuns a mais de uma espécie de pimenta, sendo que destes, 23 foram identificados em todas as amostras (6 alcanos, 2 alcoóis, 4 aldeídos, 7 ésteres, 1 furano, 1 metoxipirazina e 2 terpenos). Estes 23 voláteis comuns a todas as pimentas foram selecionados para a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* PCA), com a finalidade de determinar a contribuição destes voláteis comuns a todas as

amostras no discernimento das diferentes pimentas. Assim, esta seleção de variáveis foi realizada com o objetivo de conferir maior eficácia à análise exploratória. A matriz final utilizada para o PCA foi sustentada também pela informação de que estes componentes possuem, em sua maioria, importância odorífica para pimentas, e desta forma podem contribuir para a discriminação entre as amostras.

Tabela 1. Compostos voláteis de pimentas *Capsicum* em dois estádios de maturação por HS-SPME, e GCxGC/TOFMS. Condições de análise no texto. A: pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) imatura; B: pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) madura; C: pimenta murupi (*Capsicum chinense*) imatura, D: pimenta murupi (*Capsicum chinense*) madura; E: pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) imatura, F: pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) madura.

N	Composto	T.R. ₁	T.R. ₂	SI	LTPR. _{cal}	LTPR. _{lit}	Δ	A	B	C	D	E	F
1	acetato de metila ^a	335	2,85	886	626			x					
2	(Z)-2-hexeno ^a	355	3,08	890	631	616	-25	x					
3	2-metilfurano	385	3,12	918	650	633	-17	x				x	
4	acetato de etila	387	3,08	941	651	651	1	x	x	x	x	x	x
5	3-metil-butanal	435	3,23	871	675	650	-25	x				x	x
6	3-metil-2-butanona ^a	440	3,32	801	677	673	4	x					
7	2-metil-butanal	445	3,19	867	680	688	8	x		x		x	x
8	3-metil-2-butanol	475	0,13	908	693	692	-1	x	x	x			
9	1-penten-3-ol	475	1,76	858	694	673	-21	x	x	x		x	
10	1-penten-3-ona	478	4,07	896	696	684	-12	x	x	x	x	x	x
11	pentanal ^c	490	3,61	883	702	698	-4					x	
12	heptano ^c	490	2,44	909	701	700	-1					x	
13	2-etil-furano	490	3,37	940	702	702	0	x	x			x	
14	2,3-pentanediona ^b	490	4,44	871	702	696	-6			x			
15	metacrilato de metila ^c	510	3,77	884	712								x
16	propionato de etila ^c	515	3,36	905	714	726							x
17	1-pentanol ^c	625	3,21	926	767	768	1					x	
18	isovalerato de metila ^a	640	3,61	929	775	775	0	x	x				
19	2-metilbutanoato de metila	640	3,53	884	775	771	-4	x				x	
20	hexanal	695	4,10	890	802	802	0	x	x		x	x	x
21	pentanoato de metila ^a	755	3,93	940	824	823	-1	x	x				
22	4-metil-1-pentanol	792	3,51	951	837	838	1	x	x	x	x		
23	2-butanoato de metil-3-metila ^c	810	4,79	951	844	842	-2					x	
24	2-hexenal ^c	820	0,30	877	846	856	10					x	x

Continuação da Tabela 1

25	2-metilbutanoato de etila ^a	820	3,48	914	848	842	-6	x																
26	(E)-2-metil-3-octeno ^b	830	2,65	906	851														x	x				
27	(E)-2-hexenal	840	0,54	939	854	856	2	x	x	x									x					
28	3-metil-ciclopenteno ^c	850	0,60	870	858															x				
29	(Z)-3-hexen-1-ol ^a	852	0,55	947	858	860	2	x	x															
30	etilbenzeno ^a	860	4,12	926	863	868	5	x																
31	4-metil-3-penten-1-ol ^a	860	0,62	847	861	868	7	x	x															
32	1-hexanol	880	3,70	877	870	865		x	x	x										x				
33	3-metil-1-pentanol ^b	880	3,73	884	870	850	-20												x					
34	p-xileno	885	4,20	910	872	852	-20	x												x				
35	3-metilpentanoato de metila ^c	915	3,92	894	883	853	-30													x	x			
36	2-heptanona ^c	935	4,47	837	891	900	9													x				
37	4-metilpentanoato de metila	935	3,98	929	890	900	10	x	x											x				
38	pentanoato de etila ^a	965	3,80	908	901	898	-3	x																
39	heptanal ^c	970	4,36	922	903	901	-2														x			
40	(S)-2-heptanol ^a	973	1,60	895	903	900	-3	x	x															
41	propionato de 2-pentila ^a	1015	3,50	820	918					x														
42	Hexanoato de metila	1035	4,10	911	924	925	1	x	x												x			
43	α -pineno	1040	2,99	879	926	933	7													x	x			
44	α -triciclono	1040	2,97	894	926	923	-3	x													x	x		
45	butanoato de 2-butanila ^c	1070	3,52	874	936	953	17														x			
46	(R)- α -pineno ^c	1075	2,98	921	937	933	-4														x			
47	6-metil-3-heptanone ^a	1120	4,13	882	952					x	x													
48	camfeno ^c	1130	3,14	937	955	948	-7														x	x		
49	(Z)-2-heptenal ^c	1145	0,66	923	959	964	5														x			
50	tert-pentil butirato ^a	1150	3,31	829	962					x	x													
51	isobutirato de alfa-metilbutila ^a	1150	3,31	837	962					x														
52	4-metilpentanoato de etila ^a	1155	3,79	875	964	969	5	x	x															
53	5-metil-2-heptanol ^a	1165	1,30	880	966					x														
54	6-metil-2-heptanol ^a	1170	1,22	855	968					x														
55	acetato de hexila	1195	4,02	817	977	989	12	x													x	x		
56	sabineno ^c	1195	3,31	875	977	979	3															x		
57	1-octen-3-ona ^c	1200	4,91	846	979	975	-4															x		
58	1-octen-3-ol ^c	1210	2,80	844	981	983	2															x		
59	β -mirceno ^a	1235	3,39	843	990	992	2	x	x															
60	β -pineno ^c	1235	3,40	878	990	984	-6															x	x	
61	2-pentil-furano	1240	3,92	880	991	993	2	x	x	x											x	x	x	
62	4-etil-2,3-dimetil-2-hexeno ^b	1250	4,43	801	995																		x	
63	hexanoato de etila ^a	1260	3,87	892	998	996	-2	x																
64	(E,E)-2,4-heptadienal	1270	2,70	811	1001	1007	6	x															x	
65	2-metilbutirato de isobutila ^b	1275	3,44	915	1003	1015	13																x	
66	(R)-2-octanol ^a	1277	1,37	916	1003	997	-6	x	x															
67	(Z)-3-hexenil acetato ^b	1280	4,69	898	1005	1007	2																x	
68	Isovalerato de iso-butila ^b	1285	3,50	940	1006	1006	0																x	x
69	α -felandreno ^c	1295	3,41	854	1009	1001	-8																x	
70	isobutirato de isoamila	1300	3,50	950	1011	1021				x	x	x											x	x
71	2,7-dimetil-1,7-octadieno ^a	1330	3,72	807	1021					x														
72	o-cimeno ^c	1355	4,05	931	1029	1022	-7																x	
73	limoneno ^a	1365	3,48	911	1032	1031	-1	x	x														x	x
74	eucaliptol ^c	1380	3,58	920	1037	1039	2																x	x
75	formato de (Z)-3-hexenila ^a	1385	4,83	820	1039					x	x													

Continuação da Tabela 1

76	2-etil hexanal ^a	1390	4,21	860	1041			x											
77	2-metilbutanoato de butila ^a	1390	3,57	894	1041	1047	6	x											
78	3,4-dimetil-2-hexanona ^a	1390	4,21	862	1041	1011	-30		x										
79	(Z)- β -ocimeno ^a	1410	3,64	822	1047	1040	-7	x	x										
80	isobutirato de pentila	1415	3,58	942	1049	1057	8	x	x	x	x								
81	5-metil-5-octen-2-ol ^a	1422	1,68	816	1050			x	x										
82	2-fenilacetaldeído ^a	1430	1,61	835	1053	1043	-10	x											
83	butirato de 4-pentenila ^a	1440	4,09	830	1057			x											
84	(E)-2-octenal ^c	1455	0,59	923	1061	1052	-9												x
85	propionato de hexila	1480	3,80	864	1070	1089	19	x		x	x								
86	3-etil-2-heptanol ^a	1515	0,92	844	1081			x											
87	acetato de 4-metilhexila ^b	1515	4,09	821	1082						x	x							
88	heptanoato de metil 6-metila ^a	1530	4,05	838	1087			x											
89	γ -terpinoleno ^c	1540	3,68	882	1090	1064	-26												x
90	2-nonanona	1545	4,53	916	1092	1092	0	x	x										x
91	butirato de pentila	1550	3,79	944	1093	1092	-1	x		x	x								
92	2-metilbutanoato de isopentila	1570	3,51	895	1100	1101	2	x	x	x	x								
93	benzoato de metila ^c	1575	3,84	891	1101	1096	-5												x
94	2-nonanol ^a	1582	1,04	886	1103	1100	-3	x	x										
95	isovalerato de isopentila	1590	3,56	920	1106	1105	-1	x	x	x	x	x							x
96	acetato de heptila ^b	1605	4,11	879	1112	1115	3				x	x							
97	butanoato de 3-metila ^b	1620	4,03	856	1117	1116	-1												x
98	octanoato de metila ^a	1640	4,14	884	1123	1126	3	x											
99	2-metil-2-propenoato de hexila ^a	1675	3,28	839	1135			x											
100	butirato de (E)-3-hexenila	1685	4,00	883	1139					x	x	x							
101	2-metilbutirato de pentila	1685	3,58	905	1139			x	x	x	x								
102	butirato de (Z)-3-hexenila	1695	3,97	926	1142	1145	3	x	x	x	x								
103	isovalerato de amila	1700	3,65	930	1144	1148	4	x	x	x	x								
104	isobutirato de hexila	1710	3,60	899	1147	1150	3	x	x	x	x								
105	3-metilbutanoato de 3-metil-3-butenila	1710	4,05	877	1147			x	x	x									
106	pentanoato de 3-metil-2-butenila ^b	1715	4,13	825	1149						x	x							
107	pentanoato de isopentila ^a	1730	3,69	917	1154	1152	-2	x											
108	(Z)-dec-7-enal ^b	1735	4,65	822	1156							x	x						
109	ectocarpene	1740	3,93	893	1157	1136	-21	x	x	x	x								
110	(E,Z)-2,6-nonadienal ^c	1740	1,40	875	1156	1162	6												x
111	(E)-2-nonanal ^c	1760	0,47	934	1163	1168	5												x
112	2-pentil-tiofeno	1765	4,51	905	1166	1164	-2	x	x										x
113	2-isobutil-3-metoxipirazina	1810	0,03	874	1180	1181	1	x	x	x	x	x	x						x
114	2-decanol ^b	1815	0,60	828	1182	1188	6				x	x							
115	terpinen-4-ol ^c	1835	1,04	804	1189	1181	-8												x
116	butirato de hexila	1840	3,79	870	1191	1185	-6	x	x	x	x								x
117	2-decanona ^a	1845	4,48	914	1193	1194	1	x	x										
118	5,5-dimetil-ciclohex-3-en-1-ol ^b	1850	3,76	801	1195							x							
119	octanoato de etila ^a	1855	3,87	853	1196			x											
120	salicilato de metila	1870	4,70	926	1202	1201	-1	x	x	x	x	x							x
121	propanoato de(E)-4-hexenila ^b	1925	3,98	829	1221							x							
122	β -ciclocitral ^a	1945	0,82	847	1227	1224	-3	x	x										
123	pentanoato de (Z)-3-hexenila	1955	3,93	901	1232	1235	3	x	x	x	x								
124	isopentanoato de (Z)-3-hexenila	1965	4,04	879	1235	1243	8					x	x						
125	2-metilbutanoato de hexila	1970	3,61	939	1237	1227	-10	x	x	x	x								
126	isovalerato de hexila	1980	3,65	871	1241			x	x	x	x	x							x

3.3. Análise dos componentes principais (PCA)

As Figuras 5 e 6 ilustram, respectivamente o gráfico das amostras ou dos escores (“*score graph*”) e o gráfico das variáveis ou dos pesos (“*loading graph*”) dos dois primeiros componentes principais, os quais representaram 66,45% da variância total dos dados.

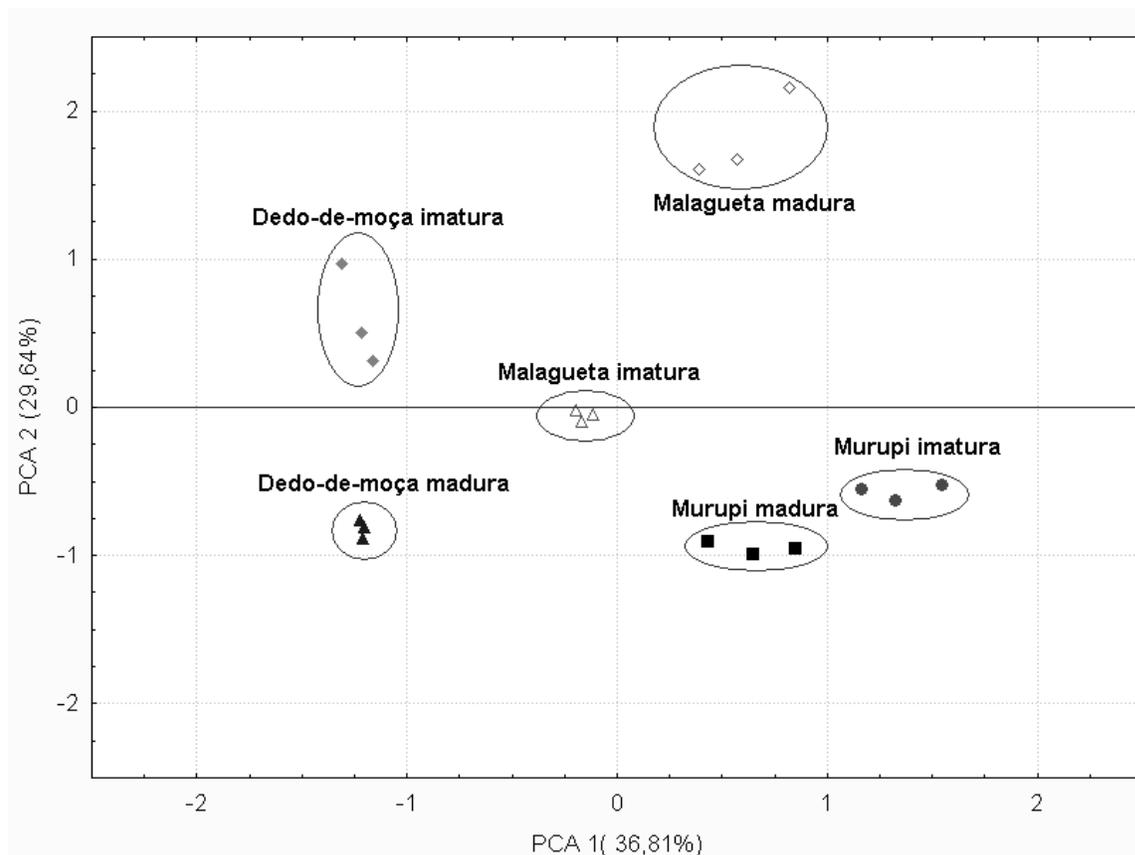


Figura 5. Gráfico das amostras ou dos escores (“*score graph*”) dos dois primeiros componentes principais do PCA dos compostos voláteis do headspace das amostras de pimenta malagueta, murupi e dedo-de-moça.

Os componentes discriminaram claramente as diferentes pimentas e os seus respectivos estádios de maturação. Para a pimenta malagueta verificou-se uma correlação negativa entre os componentes principais 1 e 2 quando se comparam os períodos de maturação, enquanto que para a pimenta murupi este

mesmo tipo de correlação pôde ser verificada em relação apenas ao componente principal 1; e na pimenta dedo de moça, tal correlação foi observada principalmente em relação ao componente principal dois.

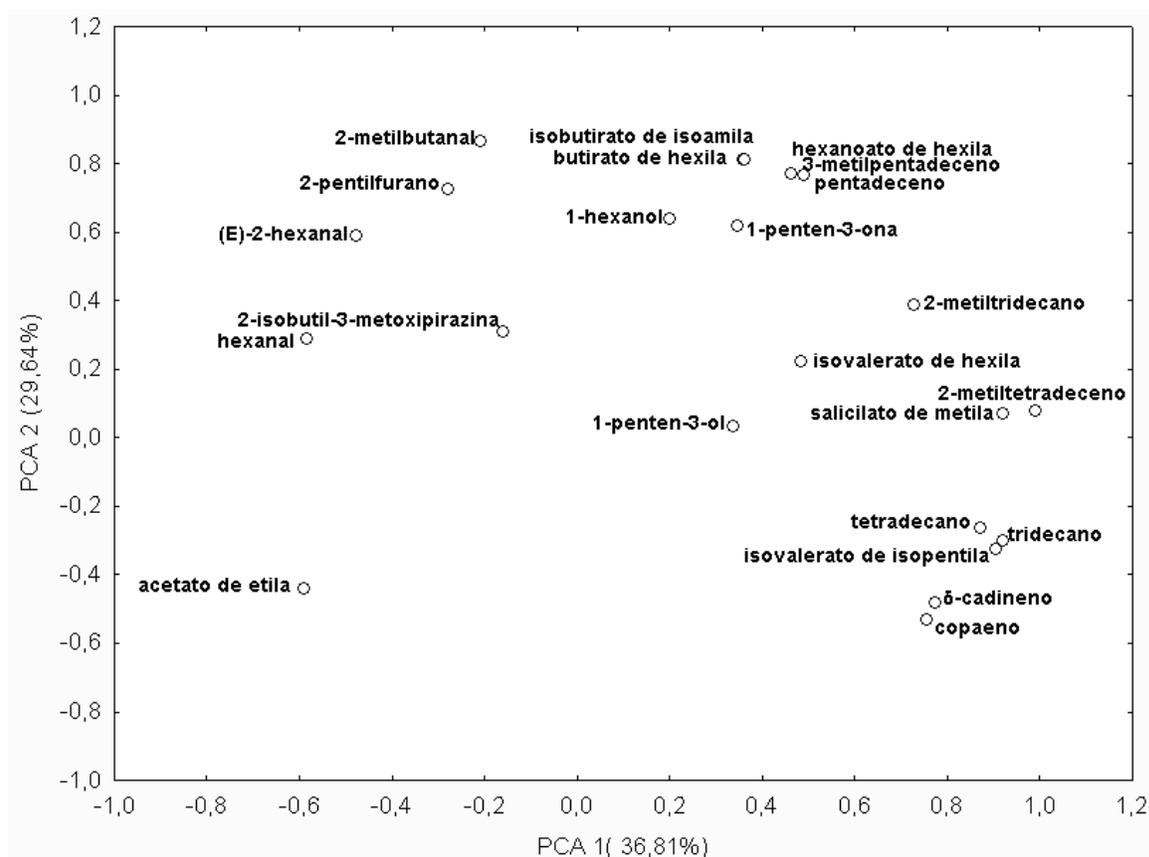


Figura 6. Gráfico das variáveis ou dos pesos (*loading graph*) mostrando os dois primeiros componente principais dos compostos voláteis para as amostras de pimenta.

Também foi observado que as amostras de pimenta malagueta foram caracterizadas principalmente por compostos provenientes da degradação de aminoácidos como os ésteres ramificados butirato de isoamila, butirato de hexila e isovalerato de hexila (aroma frutal)²⁴, e por produtos da degradação de ácidos graxos como o éster alifático hexanoato de hexila e pelo álcool 1-hexanol (ambos de aroma frutal)²⁴; além de alcanos como 3-metilpentadeceno e pentadeceno,

provavelmente, provenientes da degradação de ácidos graxos ou da degradação de carotenóides; deve-se salientar que tais alcanos de cadeia longa possuem pouca relevância odorífica.^{23, 24} Enquanto que a pimenta murupi foi caracterizada por produtos da via dos terpenóides como os sesquiterpenos copaeno (amadeirado) e δ -cadineno (verde, doce)²⁴, bem como por produtos da degradação de aminoácidos tais como o éster aromático salicilato de metila (doce), e os metil ésteres isovalerato de hexila e isovalerato de isopentila (ambos de aroma frutal)²⁴, além dos alcanos tridecano, tetradecano e 2-metil tetradeceno. Já a pimenta dedo-de-moça foi caracterizada pela presença de produtos derivados de ácidos graxos como os aldeídos como o 2-metil-butanal, (E)-2-hexanal, hexanal e o éster alifático acetato de etila (frutal)^{24, 25}, do derivado do metabolismo de carboidratos 2-pentil-furano (amanteigado)²⁴, e de degradações de aminoácidos como a 2-isobutil-3-metoxipirazina (pimentão verde)²⁴.

Verificou-se assim que as amostras apresentaram alguma dispersão no gráfico dos escores, especialmente no caso da pimenta malagueta. Esta dispersão deve-se aos maiores coeficientes de variação observados nas triplicatas de extração para este tipo de amostra, os valores elevados obtidos para os coeficientes de variação devem-se provavelmente a erros experimentais comuns relacionados ao uso de técnicas de extração baseadas em equilíbrio como é o caso do SPME.

4. CONCLUSÕES

A metodologia de cromatografia gasosa bidimensional compreensiva desenvolvida foi aplicada com sucesso na análise da fração volátil das pimentas

malagueta, murupi e dedo de moça em dois estádios de maturação. No total, foram tentativamente identificados 220 compostos voláteis pertencentes a diferentes classes químicas como alcoóis, ésteres, aldeídos, cetonas, furanos, pirazinas e terpenos. Dentre estes voláteis identificados, 24 foram selecionados para análise de componente principal devido ao fato de estarem presentes em todas as amostras analisadas. A análise exploratória evidenciou o discernimento das três amostras investigadas entre si e também segundo seus estádios de maturação. A pimenta malagueta foi discriminada, principalmente, por compostos pertencentes ao grupo dos ésteres ramificados, a pimenta murupi, por sesquiterpenos e a pimenta dedo de moça pela presença de aldeídos e metoxipirazina.

5. REFERÊNCIAS

1. Pruthi, J. S. *Spices and condiments*. In Chichester, E. M. & Stewart, G. F. (Eds.). **1980**. New York: Academic Press.
2. Sousa, E.T.; Rodrigues, F.M.; Martinsa, C.C.; et al. J.B. *Microchem. J.* **2006**, 82, 142-149.
3. Reifschneider, F. J. B. (Org.) *Capsicum - pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, **2000**.
4. Pino, J.; González, M.; Ceballos, L.; et al. *Food Chem.* **2007**, 104, 1682-1686.
5. Mazida, M.M.; Salleh, M. M. and Osmanet, H. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2005**, 18 427–437.
6. Wu, C., & Liou, S. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 770–772.

7. Whitfield, F.B., Last, J.H., **1991**. Vegetable. In: H. Maarse et al. (Eds.), *Volatile Compounds in Food and Beverages*. Dekker, New York, pp. 203–281.
8. Cremer, D.R., & Eichner, K. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2454–2460.
9. Buttery, R.G., Seifert, R.M., Guadagni, D.G., Ling, L.C., *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, 1322–1327.
10. Guadayol, J. M.; Caixach, J.; Ribé, J.; et al. *J Agriculture Food Chem.* **1997**, 45, 1868–1872.
11. Forero, M. D.; Quijano, C.E., Pino, J.A. *Flavour Fragr. J.* **2009**, 24, 25-30.
12. Davis, J.M. & Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 418-421.
13. Schoenmakers, P. J.; Marriott, P. J.; Beens, J.; *LGCC Eur.* **2003**, 1.
14. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriot, P. J.; *Quim. Nova*, **2006**, 682-687.
15. de Geus, H. J.; Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1996, 15, 168
16. Cardeal, Z. L.; Games da Silva, M.D.R.; Marriott, P.J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 2823–2836.
17. Liu, Z. & Phillips, J.B. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, 29, 227-231.
18. Pedroso, M. P.; Godoy L. A. F., Fidelis, V. C. H.; et al. *Quím. Nova*, **2009**, 32, 421-430.
19. von Mühlen, C. *Tese de doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil, **2007**.
20. Pierce, K.M.; Hope; J.L. Hoggard, J.C.; Synovec; R.E. *Talanta*, **2006**, 70, 797–804.
21. van Den Dool, H.; Kratz, P. D.; *J. Chromatogr. A.* **1963**, 11, 463.

22. Beens, J.; Blomberg, J.; Schoenmakers, P. J.; J. *High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 182.
23. Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn E. *The Plant Journal.* **2008**, 54, 712–732.
24. The Pherobase, em www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php, acessado em 08 de janeiro de 2010.
25. Flavornet and human odor space, em: http://www.flavornet.org/f_kovats.html acessado em 08 de janeiro de 2010.

CAPÍTULO 5

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS PIMENTAS MALAGUETA (*CAPSICUM FRUTESCENS*), DEDO-DE-MOÇA (*CAPSICUM BACCCATUM* VAR. *PENDULUM*) E MURUPI (*CAPSICUM CHINENSE*)

Stanislau Bogusz Junior¹ & Helena Teixeira Godoy¹

Artigo segundo as normas de publicação 2009 da revista Química Nova.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6121, Campinas – SP, Brasil.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF CHILI PEPPERS “MALAGUETA” (*Capsicum frutescens*), “DEDO-DE-MOÇA” (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) and “MURUPI” (*Capsicum chinense*): This study evaluated the antioxidant potential of three types of *Capsicum* chili peppers: “malagueta” (*Capsicum frutescens*), “dedo-de-moça” (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) and “murupi” (*Capsicum chinense*), at two different maturation stages and at two different years. For the analyses, the test of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu and the tests of antioxidant activity by the methods of ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the DPPH• radical scavenging assay (2,2 -diphenyl-1-picrilhidrazil) were used. The highest values of phenolic compounds were observed for samples of immature stage in the first year, also were observed that the average values of total phenolics increased with the maturation of all peppers investigated. Positive correlations between the results of phenolic compounds and the methods of antioxidant power were found, and this correlation was higher for the FRAP method than for the DPPH•, probably because of the different principles of action of these methods.

Keywords: *Capsicum*, Total phenolic compounds, FRAP, DPPH•

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode ser definido como a condição biológica em que ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies quimicamente reativas e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem seus danos. Estas espécies reativas incluem diversos radicais, como por exemplo, $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, NO^{\cdot} , complexos de metais de transição, intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 , $ONOO^-$) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ($^1O_2^*$, O_3 , Fe, Cu).^{1, 2, 3} Além disso, cátions metálicos sem atividade redox direta como, por exemplo, os cátions dos metais Pb, Cd, Bi e Al podem se ligar fortemente aos grupos fosfatos dos fosfolipídios de membranas celulares, diminuindo sua fluidez e aumentando sua peroxibilidade.¹ As conseqüências do estresse oxidativo estão associadas aos processos de envelhecimento e patologias degenerativas como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares e danos ao DNA como mutagênese e carcinogênese.^{2, 3-8}

Diversas pesquisas têm apontado para a existência de uma relação inversa entre a ingestão de alimentos de origem vegetal e o risco de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.⁹⁻¹³ Assim, o mercado de alimentos tem se mostrado ávido por produtos que contenham em sua composição alguma substância biologicamente ativa capaz de desencadear processos metabólicos ou fisiológicos de redução dos efeitos das oxidações biológicas. Tal redução tem sido atribuída a diversos compostos bioativos presentes nestes alimentos, dentre eles, os compostos fenólicos.

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos

funcionais. Derivam do metabolismo secundário, mais especificamente da via do ácido chiquimico e do metabolismo dos fenilpropanóides.¹⁵ Estima-se que existam mais de cinco mil fenólicos descritos na literatura, entre estes destacam-se como antioxidantes os flavonóides, os ácidos fenólicos, as cumarinas, os taninos, as ligninas e os tocoferóis.^{16, 17}

Diversos trabalhos na literatura atribuem a pimentas *Capsicum*, propriedades antioxidantes, principalmente por estas serem fontes de flavonóides e capsaicinóides, que são seus fenólicos predominantes, entretanto, já foi relatada a presença de pequenas quantidades de ácido protocatecuico, clorogênico, cumárico e ferrúlico em algumas variedades de *Capsicum*.¹⁸

Vários são os métodos para testar a atividade antioxidante, podendo ser usados para compostos isolados e extratos. Estes métodos podem ser testados *in vitro* e *in vivo*. Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois existem vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, sendo seqüestro de radicais, habilidade redutora, complexação de íons metálicos e outros. Também há uma dificuldade de comparar estes métodos, devido à complexidade e princípios diferentes das reações. Alguns métodos antioxidantes produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se algumas vezes impossível qualquer comparação entre eles.¹⁹

O objetivo do presente trabalho foi investigar os teores de compostos fenólicos totais, e o poder antioxidante pelos métodos de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH*) e pelo método de redução do ferro (FRAP), nas pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum*

baccatum var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*), em diferentes estádios de maturação e em diferentes épocas do ano.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras: As amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi (cerca de 2 kg de cada espécie) foram obtidas junto ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) na cidade de Campinas, São Paulo - Brasil. Os genótipos selecionados para o estudo foram obtidos do banco de germoplasma do setor de Hortaliças do IAC - Campinas. As plantas foram cultivadas sob tratamentos similares de fertilizantes e irrigação, em dois períodos, sendo um de abril a julho de 2008 e o outro de janeiro a maio de 2009. A identificação botânica das plantas foi realizada pela Dr^a. Arlete Marchi Tavares de Melo, pesquisadora do IAC - Campinas. As amostras de pimenta foram coletadas em dois estádios de maturação: fisiológica (desenvolvimento máximo em tamanho, porém ainda imaturas) e comercial (desenvolvimento completo em tamanho e cor). Uma vez coletadas, estas foram imediatamente transportadas ao laboratório para as análises.

2.2. Preparo das amostras: Para as análises, foram obtidos extratos das amostras seguindo o procedimento de extração otimizado para análises de extratos vegetais por Scherer (2008)²⁹: alíquotas de 100 g dos frutos inteiros das pimentas *in natura* foram trituradas em liquidificador, após, pesou-se 30,00g das amostras trituradas em erlenmeyer de 250 mL (envoltos em papel alumínio, para evitar a exposição das amostras à luz direta) e adicionou-se 100,0 mL de metanol

P.A. (marca Synth). Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação por 3 h, após, esse período, o extrato foi filtrado em papel de filtro e no sólido recuperado foram adicionados mais 100,0 mL de metanol. Este sólido foi novamente submetido à agitação por mais 1 h e posteriormente filtrado. Uniu-se as duas parcelas filtradas e estas foram concentradas em rotaevaporador a 38 °C até a obtenção dos extratos secos, estes foram então armazenados em frascos âmbar e mantidos a -20 °C até o momento das análises. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

2.3. Compostos fenólicos totais (CFT): A determinação dos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando 0,5 mL dos extratos na concentração de 1,3 mg.mL⁻¹ em metanol e 2,5 mL do reagente Folin diluído em água destilada (1:10). Após 5 minutos, adicionou-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. A reação ocorreu durante 2 horas no escuro e a absorbância foi monitorada a 740 nm. O teor de CTF foi determinado utilizando uma curva padrão de ácido gálico com as seguintes concentrações: 0,01; 0,03; 0,05; 0,06; 0,08 mg.mL⁻¹ ($r = 0,998$) Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de extrato seco.

2.4. Ação antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP): A atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP- “*Ferric Reducing Antioxidant Power*”) foi realizada seguindo a metodologia de Benzie e Strain (1996), com modificações. Para o preparo do reagente de FRAP foram utilizados: tampão

acetato 300 mmol.L^{-1} (pH final 3,6); reagente TPTZ 10 mmol.L^{-1} em solução de HCl 40 mmol.L^{-1} e solução de FeCl_3 20 mmol.L^{-1} de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O reagente de FRAP foi preparado misturando estas soluções na proporção 10:1:1. No tubo de reação foram adicionados: 1,2 mL de reagente de FRAP; 0,12 mL de água ultrapurificada em sistema Milli Q e 0,04 mL de amostra na concentração de $0,53 \text{ mg.mL}^{-1}$. Após adicionar cada um dos componentes no tubo de reação, estes foram colocados por 15 minutos em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, após os 15 minutos de incubação, os tubos foram retirados do banho-maria e permaneceram a temperatura ambiente por 4 minutos para estabilização da temperatura e então foram realizadas as leituras a 593 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg de ácido gálico. g^{-1} de amostra.

2.5. Ação antioxidante pelo método do radical livre DPPH•: A atividade antioxidante foi determinada através do método DPPH• segundo Xu et al. (2005) com modificações. Foram utilizados 3,9 mL de solução do radical livre DPPH• (0,1mM) em metanol e 0,1 mL dos extratos diluídos em metanol em diferentes concentrações. No controle foram utilizados 3,9 mL de DPPH• (0,1 mM) em metanol e 0,1 mL dos padrões em metanol. No branco foram utilizados 3,9 mL de DPPH• (0,1 mM) em metanol e 0,1 mL de metanol. Após a adição dos extratos, os tubos foram agitados vigorosamente e deixados por 90 minutos no escuro. Após este período, a atividade antioxidante foi medida em um espectrofotômetro (517 nm), previamente calibrado com metanol. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O índice DPPH• foi calculado através da seguinte fórmula: $I (\%) = [(Abs0 - Abs1)/Abs0] \times 100$, onde Abs0 é a absorvância do branco e Abs1 é a

absorbância da amostra. O IC₅₀ (quantidade suficiente para 50% de inibição do radical livre DPPH[•]) foi calculado por meio da equação da reta obtida da curva de calibração concentração versus o índice DPPH[•] correspondente ($r = 0,999$). Os resultados de DPPH[•] também foram expressos em termos de índice de ação antioxidante (IAA) proposto por Scherer & Godoy 2008, onde:

$$AAI = \frac{\text{concentração final de DPPH}^{\bullet} \text{ (ug.mL}^{-1}\text{) no tubo de reação}}{IC_{50} \text{ (ug.mL}^{-1}\text{)}}$$

2.6. Análise estatística: A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 6.0, sendo o teste ANOVA utilizado para comparação de médias, e o teste de tukey para verificar as diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimentos de extração

A Tabela 1 apresenta os resultados dos rendimentos das extrações expressos em gramas de extrato por 100g de amostra fresca (%) para os extratos das pimentas segundo seus graus de maturação em dois anos distintos.

As amostras de pimenta malagueta foram as que apresentaram o maior rendimento de extração no estágio imaturo no primeiro ano de colheita, seguida da pimenta murupi e dedo-de-moça. No estágio maduro, para este mesmo ano de colheita a pimenta dedo-de-moça foi a que apresentou os maiores valores de rendimento de extrato, seguida da murupi e malagueta. Enquanto que no segundo ano também foi verificado um maior rendimento de extração no estágio imaturo para a pimenta malagueta, seguida da murupi e dedo-de-moça, enquanto que nas

amostras maduras deste mesmo ano de colheita, a pimenta malagueta foi a que apresentou o maior valor de rendimento de extração seguida da murupi e da dedo-de-moça. A menor variação de rendimento de extrato foi encontrada nas amostras imaturas do ano de 2009.

Tabela 1. Rendimento das extrações (%) das pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*) nos estádios de maturação tecnológico (imatura) e comercial (madura) e em anos distintos.

Pimentas	Rendimento das extrações (%)			
	2008		2009	
	Imatura	Madura	Imatura	Madura
Malagueta	4,88 ^{aB} ± 0,21	8,35 ^{bA} ± 0,41	4,67 ^{aB} ± 0,23	8,39 ^{aA} ± 0,47
Dedo-de-moça	4,41 ^{bC} ± 0,02	10,87 ^{aA} ± 0,77	4,48 ^{aC} ± 0,11	6,51 ^{cB} ± 0,16
Murupi	4,44 ^{bC} ± 0,08	10,01 ^{aA} ± 0,40	4,66 ^{aC} ± 0,05	7,59 ^{bB} ± 0,07

Os resultados são as médias ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey ($p < 0,05$) nos rendimentos de extração das diferentes pimentas. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey ($p < 0,05$) entre períodos de maturação e anos distintos para uma mesma amostra.

Verificou-se que foram obtidos maiores rendimentos de extração para as amostras maduras em ambos os anos de colheita. Possivelmente estes maiores valores de rendimento de extração, provavelmente, estão relacionados aos processos bioquímicos de síntese que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos.¹⁹

As análises estatísticas (ANOVA e Tukey) realizadas para os resultados de rendimento de extração mostraram que no ano de 2009 as três amostras de pimenta no estágio imaturo não apresentaram diferenças estatísticas

significativas. Considerando-se os anos de colheita para a pimenta malagueta pôde-se observar que os estádios imaturos não diferiram significativamente entre os anos de 2008 e 2009, bem como os estádios maduros; para as amostra de dedo-de-moça, os estádios imaturos não apresentaram diferença significativa entre os anos de colheita, enquanto que os estádios maduros apresentaram diferenças significativas e para a pimenta murupi os resultados foram similares aos encontrados para a dedo-de-moça, não ocorrendo diferenças estatísticas entre os estádios imaturos de ambos os anos, mas ocorrendo diferenças significativas para os estádios maduros entre 2008 e 2009.

3.2. Compostos fenólicos totais (CFT)

A determinação dos CFT pelo método de Folin-Ciocalteu se fundamenta em mecanismos de oxidação/redução, mais especificamente na capacidade que os compostos fenólicos possuem de reduzir, em meio alcalino, uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungústico, de cor amarela (forma oxidada), para complexos molibdênio-tungstênio de cor azul (forma reduzida).²⁰ Desse modo, o número de grupos hidroxilas ou de compostos potencialmente oxidáveis controlam a intensidade da cor formada que é então avaliada espectrofotometricamente.

Os resultados de CFT para as amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra encontram-se na Tabela 2. Considerando-se todas as amostras analisadas, verificou-se que os maiores valores médios de CFT foram observados nas amostras em estágio maduro no primeiro ano de colheita, além disso, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas nos valores de CFT para as diferentes pimentas neste

período de maturação e ano. Ademais, a pimenta malagueta madura colhida em 2008 foi a que apresentou os maiores valores de CFT em ambos os estádios de maturação, seguida das pimentas maduras murupi e dedo de moça. No ano de 2009, a pimenta malagueta também apresentou os maiores valores em ambos os estádios.

Os valores de CFT aumentaram com o processo de maturação nos dois anos de colheita nas três amostras. Estes resultados divergem dos encontrados por Estrada et al.²³, que empregando extração com metanol-água (80%), verificaram em suas análises uma diminuição dos CFT com o amadurecimento dos frutos de *Capsicum*, passando de 215 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (14 dias após o florescimento) para 73 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (42 dias após o florescimento) em peso seco.

Os menores valores de CFT foram verificados para a pimenta dedo-de-moça em todos os períodos de maturação e anos. Lee et al.²¹ e Racchi et al.²² relataram um conteúdo de fenólicos totais em suco de pimentões, obtidos por centrifugação, entre 1.180 a 3.849 mg.Kg^{-1} expresso em ácido clorogênico em peso fresco. Enquanto que Chuah et al.²⁴ encontraram 1,01 mg de ácido gálico. g^{-1} de pimentões frescos; 0,78 e 0,75 mg de ácido gálico. g^{-1} de páprica das variedades vermelha e laranja; e 0,63; 0,47 e 0,44 mg de ácido gálico. g^{-1} de páprica amarela, páprica verde e pimenta verde, respectivamente. Os valores encontrados para pimentões por Chuah et al.²⁴ assemelham-se aos valores encontrados para as amostras de dedo-de-moça imaturas em ambos os anos analisados.

Tabela 2. Compostos fenólicos totais (mg ac. gálico.g⁻¹ de amostra) das pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*) nos estádios de maturação tecnológico (imatura) e comercial (madura) e em anos distintos.

Pimentas	CFT (mg ac. gálico.g ⁻¹ amostra)			
	2008		2009	
	Imatura	Madura	Imatura	Madura
Malagueta	1,25 ^{aC} ± 0,05	2,39 ^{aA} ± 0,30	1,44 ^{aBC} ± 0,09	1,79 ^{aB} ± 0,01
Dedo-de-moça	0,95 ^{bB} ± 0,04	2,15 ^{aA} ± 0,20	1,05 ^{bB} ± 0,06	1,19 ^{cB} ± 0,03
Murupi	1,17 ^{aB} ± 0,10	2,26 ^{aA} ± 0,34	1,19 ^{bB} ± 0,05	1,49 ^{bB} ± 0,10

Os resultados são as médias ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) no teor de compostos fenólicos totais das diferentes pimentas. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) entre períodos de maturação e anos distintos para uma mesma amostra.

3.3. Ação antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O método FRAP se fundamenta na capacidade que compostos antioxidantes possuem de transferir elétrons, mais especificamente, na capacidade que possuem de reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe⁺³-TPTZ) para sua forma reduzida (Fe⁺²-TPTZ), que pode então ser avaliado espectrofotometricamente (595 nm).

Os resultados de atividade antioxidante pelo método de redução do ferro para as amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra encontram-se na Tabela 3. Considerando-se todas as amostras analisadas, verificou-se que os maiores valores médios de atividade antioxidante foram observados nas amostras em estágio maduro no primeiro ano de colheita, além disso, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas nos valores para as diferentes pimentas neste período de maturação

e ano. No ano de 2009, os maiores valores de atividade antioxidante foram verificados para os estágios maduros nas três amostras analisadas. Ademais, a pimenta malagueta madura colhida em 2008 foi a que apresentou os maiores valores de atividade antioxidante em ambos os estádios de maturação, seguida das pimentas maduras murupi e dedo de moça. Já no ano de 2009, a pimenta malagueta apresentou os maiores valores apenas para o estágio maduro, sendo que para estágio imaturo os resultados obtidos foram os menores dentre as três analisadas.

Tabela 3. Resultados de FRAP (mg ac. gálico.g⁻¹ de amostra) das pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*) nos estádios de maturação tecnológico (imaturo) e comercial (maduro) e em anos distintos.

Pimenta	FRAP (mg ac. gálico.g ⁻¹ amostra)			
	2008		2009	
	Imatura*	Madura*	Imatura*	Madura*
Malagueta	0,96 ^{aC} ± 0,07	1,76 ^{aA} ± 0,27	1,13 ^{aCB} ± 0,07	1,37 ^{aB} ± 0,06
Dedo-de-moça	0,75 ^{cC} ± 0,03	1,60 ^{aA} ± 0,03	0,82 ^{bC} ± 0,05	0,99 ^{bB} ± 0,03
Pimenta murupi	0,88 ^{abC} ± 0,04	1,73 ^{aA} ± 0,12	0,91 ^{bC} ± 0,01	1,12 ^{bB} ± 0,07

Os resultados são as médias ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) para os valores de FRAP das diferentes pimentas. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) entre períodos de maturação e anos distintos para uma mesma amostra.

Percebeu-se que, assim como para os CFT, os valores de atividade antioxidante pelo método de redução do ferro aumentaram com o processo de maturação nos dois anos de colheita nas três amostras.

A maioria dos resultados encontrados para atividade antioxidante pelo método de redução do ferro é expressa em equivalente trolox ou em mmol de Fe^{2+} e, em função disso, não foi possível comparar os resultados de FRAP para as pimentas com os dados da literatura de maneira coerente.

3.4. Ação antioxidante pelo método do radical livre DPPH•

O método do radical livre DPPH• fundamenta-se na capacidade que substâncias antioxidantes possuem de seqüestrar radicais livres, no caso o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazida (DPPH•) de cor púrpura. Este, ao ser reduzido por compostos fenólicos, adquire coloração amarela. Desta forma, é possível medir a descoloração do radical livre DPPH• espectrofotometricamente (515 nm) e assim estimar o poder antioxidante de uma amostra.²⁵

Os resultados de DPPH• para os extratos de pimenta expressos em termos de IC_{50} e AAI encontram-se na Tabela 4. Os menores valores de IC_{50} foram observados para as amostras de pimenta malagueta em todos os estádios de maturação e nos dois anos, enquanto que os menores valores para ambos os estádios de maturação e ambos os anos foram observados para as amostras de pimenta dedo-de-moça. Os valores de IC_{50} indicam a quantidade de extrato necessária para provocar o seqüestro de 50% do radical livre DPPH•, portanto, altos valores deste parâmetro indicam uma menor capacidade antioxidante, uma vez que é necessária uma maior quantidade de extrato para alcançar tal efeito.

O IAA, proposto por Scherer & Godoy²⁶, é uma forma de expressar os valores obtidos para as análises de DPPH• que permite eliminar o frequente problema de comparação de resultados de ação antioxidante expressos em diferentes unidades e em diferentes diluições. Este, por levar em conta os valores

de concentração final de DPPH• no tubo de reação e os valores de IC₅₀, é adimensional, permitindo tais comparações. Ainda segundo os mesmos autores, o poder antioxidante de um extrato por DPPH• é avaliado conforme a seguinte escala: fraco IAA < 0,5; moderado IAA de 0,5 a 1,0; forte AAI entre 1,0 e 2,0, e muito forte quando IAA > 2,0.

Considerando a escala de avaliação do poder antioxidante, pode se verificar que as amostras de pimenta apresentaram uma fraca ação antioxidante segundo seus valores de IAA. Entretanto, é necessário considerar, que a escala de IAA foi criada utilizando-se padrões puros de compostos fenólicos, e que as pimentas por se tratarem de frutos apresentam muitos de seus fenólicos glicosilados, e desta forma estes podem estar pouco disponíveis para o sequestro do radical livre DPPH•, necessitando de uma prévia hidrólise ácida ou enzimática (como as que ocorrem no organismo humano) para expressarem sua real ação.

Verifica-se que as amostras de pimenta apresentaram maiores valores de IAA no estágio maduro no primeiro ano de produção, enquanto que as amostras imaturas do segundo ano foram as que apresentaram os menores valores de AAI.

Tabela 4. Resultados de DPPH* (IC₅₀ e IAA) das pimentas malagueta (*Capsicum frutescens*), dedo-de-moça (*Capsicum baccatum var. pendulum*) e murupi (*Capsicum chinense*) nos estádios de maturação tecnológico (imatura) e comercial (madura) em anos distintos.

Pimenta	DPPH*							
	2008				2009			
	Imatura		Madura		Imatura		Madura	
	IC ₅₀ (g/mL)	IAA						
Malagueta	0,66 ^{cB} ± 0,01	0,12 ^{aC} ± 0,02	0,35 ^{cD} ± 0,01	0,22 ^{aA} ± 0,02	0,80 ^{cA} ± 0,01	0,10 ^{aD} ± 0,01	0,41 ^{cC} ± 0,01	0,19 ^{aB} ± 0,03
Dedo-de-moça	1,10 ^{aB} ± 0,02	0,07 ^{cC} ± 0,01	0,50 ^{aD} ± 0,01	0,15 ^{cA} ± 0,01	1,27 ^{aA} ± 0,01	0,06 ^{cD} ± 0,01	0,66 ^{aC} ± 0,01	0,12 ^{cB} ± 0,01
Murupi	0,87 ^{bB} ± 0,01	0,09 ^{bC} ± 0,01	0,41 ^{bD} ± 0,01	0,19 ^{bA} ± 0,02	1,07 ^{bA} ± 0,02	0,07 ^{bD} ± 0,01	0,53 ^{bC} ± 0,03	0,15 ^{bB} ± 0,01

Os resultados são as médias ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) para os valores de IC₅₀ e IAA entre as diferentes pimentas. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de tukey (p<0,05) para os valores de IC₅₀ e IAA entre os períodos de maturação e entre os anos diferentes para uma mesma amostra.

3.5. Correlação entre os teores de CFT, FRAP e DPPH[•]

Nas Figuras 1 e 2, pode-se observar os gráficos de correlação entre as variáveis compostos fenólicos totais (CFT), e resultados de FRAP e entre as variáveis CFT e resultados de DPPH[•], respectivamente. Verificou-se que as variáveis CFT e FRAP estão correlacionadas positivamente ($p < 0,05$), ou seja, um aumento de CFT em 1 mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, aumentará em 0,608 mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra os valores de FRAP. Também foi observada uma correlação positiva ($p < 0,05$) para os resultados de CFT e DPPH[•], ou seja, um aumento de CFT em 1 mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, levará a um incremento dos valores de DPPH[•], de 0,019 mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra.

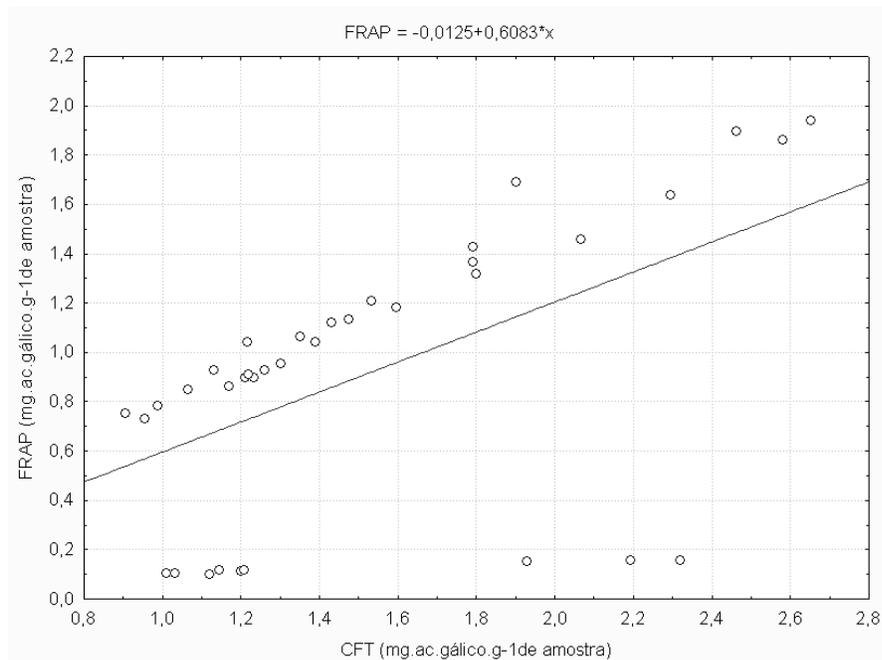


Figura 1. Correlações entre as variáveis compostos fenólicos totais (CFT) e resultados de FRAP.

Tais resultados podem estar relacionados aos diferentes mecanismos de ação dos métodos antioxidantes empregados para as amostras de pimenta, pois enquanto o método de FRAP possui como fundamento a transferência de elétrons, o de DPPH• é baseado em transferência de hidrogênio, e desta forma, o impedimento estérico ao radical livre DPPH•, devido à magnitude das grandes moléculas, ou mesmo à possibilidade de estas estarem glicosiladas, pode afetar os resultados para este método.

Tal afirmação fundamenta-se no trabalho de Iorizzi et al.²⁷ que identificaram a presença de ácido (Z)-p-cumárico-4-O-β-D-glucosídeo, ácido (E)-sináptico-β-D-glucosídeo e ácido vanílico-β-D-glucosídeo em pimentões, e no de Matereska & Peruca²⁸ que isolaram diversos ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados em 5 variedades de *Capsicum*, sendo que os encontrados em maiores quantidades foram glicosídeos dos ácidos sináptico e ferrúlico em frutos maduros, enquanto que, em frutos imaturos a quercetina-3-O-L-ramnosídeo foi o composto mais abundante.

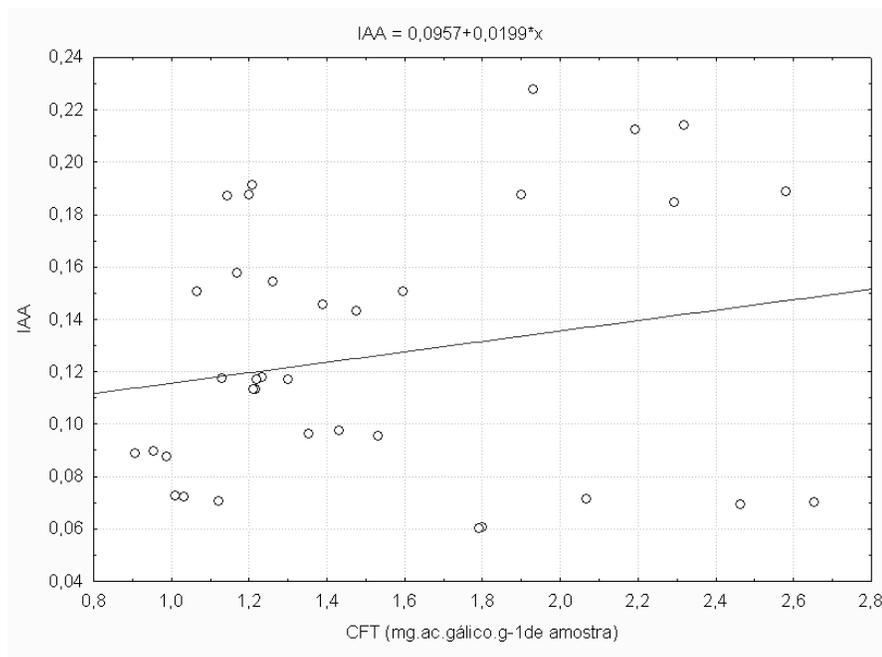


Figura 2. Correlações entre as variáveis compostos fenólicos totais (CFT) e resultados de DPPH• .

4. CONCLUSÕES

As amostras de pimenta malagueta, dedo-de-moça e murupi apresentaram maiores rendimentos de extração no estágio maduro do que no estágio imaturo nos dois anos de estudo. Os maiores resultados de CFT expressos em mg ácido gálico.g⁻¹ de amostra, foram observados para as amostras imaturas do primeiro ano, e os resultados médios de CFT aumentaram com o amadurecimento das pimentas. Os resultados de ação antioxidante por FRAP foram maiores que os verificados por DPPH•. Observou-se também a existência de correlações positivas entre estes resultados e os de CFT e os métodos de ação antioxidantes utilizados, sendo que existe uma maior correlação entre os valores de fenólicos totais e FRAP, provavelmente, devido à menor importância que o

impedimento estérico exerce sobre os diferentes mecanismos de ação antioxidante dos métodos empregados.

5. REFERÊNCIAS

1. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, **2007**.
2. Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 1323.
3. Finkel, T.; Holbrook, N. J.; *Nature* **2000**, 408, 239.
4. Ames, B N.; Shigenaga, M K.; and Hagen, T M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***1993**, 90, 7915-7922.
5. Witzum, J.L. *Lancet*. **1994**, 12; 344(8933):1363-4.
6. Roy, P., & Kulkarni, A.P. *Food Chemical Toxicology*. **1996**, 34, 563-570.
7. Stahl, W., & Sies, H. *Diabetes, New York*. **1997**, 46, 14-18.
8. Poulsen, H.E., Prieme, H., Loft, S. *European Journal of Cancer Prevention*, **1998**, 7, 9-16.
9. Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. *Free Rad Res* **2000**; 33: 91-103.
10. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. *Lancet* **1993**; 342: 1007-1011.
11. Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. *Biochem Soc Trans* **1996**; 24: 785-9.
12. Hollman PCH. *J Sci Food Agric* **2001**; 81: 842-52.
13. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. *Brit Med J* **1996**; 312: 478-81.
14. Anjo, D.F.C. *J Vasc Br*. **2004**, 3, 145-54.

15. Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. *Food Chem.***1999**, 66, 401-436.
16. Angelo PM & Jorge N. *Rev Inst Adolfo Lutz*, **2007**, 66,1-9.
17. Shahidi F & Naczk M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. 2nd Ed. Lancaster: Technomic; **1995**.
18. Estrada, B., Bernal, M.A., Diaz, J., Pomar, F., and Merino, J. *Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 6234–6239.
19. Cheftel, J.C.; Cheftel, H.; Bensaçon, P. Introducción a la bioquímica y tecnología de los Alimentos. Vol. II., Zaragoza (España). E. Acribia.
20. Prior, R. L.; Wu, X. and Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290-4302.
21. Lee, Y., Howard, L.R., and Villalon, B. J. *Food Sci.***1995**, 60, 473–476.
22. Racchi, M., Daglia, M., Lanni, C., Papetti, A., Govoni, S., and Gazzani, G. J. *Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1272–1277.
23. Estrada, B., Bernal, M.A., Diaz, J., Pomar, F., and Merino, F. J. *Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 6234–6239.
24. Chuah, A. M.; Lee, Y.C.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Yin, L.J.; Matoba, T. *Food Chemistry*. **2008**,111, 20–28.
25. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; and Berset.; C. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1995, 28, 25-30.
26. Scherer R. & Godoy H.T. *Food Chem.* **2009**, 112, 654-658
27. Iorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Zollo, F., Blanco-Molina, M., Macho, A., and Munoz, E. J. *Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2022–2029.
28. Materska, M. & Perucka, I. J. *Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1750-1756.

29. Scherer, R. *Tese de doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia de HS-SPME com o uso da fibra DVB/CAR/PDMS, se mostrou eficiente para extrair os voláteis das pimentas *Capsicum*, apresentando boa repetibilidade. A otimização multivariada das condições de extração permitiu conhecer os melhores valores de tempo e temperatura para a extração (40 C e 80 min).

Com a aplicação das técnicas de GC 1-D foi possível identificar 83 compostos voláteis em pimenta malagueta, 50 em pimenta dedo-de-moça e 79 em pimenta murupi, em dois estádios de maturação e dois anos distintos. Enquanto que com a técnica de GCxGC/TOFMS foram identificados 125 compostos em pimenta malagueta 123 compostos em pimenta murupi e 75 compostos em dedo de moça.

A análise dos componetes principais evidenciou o discernimento das três pimentas investigadas entre si e também segundo seus estádios de maturação, sendo que a pimenta malagueta foi discriminada principalmente por compostos pertencentes ao grupo dos ésteres ramificados, a pimenta murupi, por sesquiterpenos e a pimenta dedo de moça pela presença de aldeídos e metoxipirazina.

As análises do potencial antioxidante, realizadas através dos ensaios de compostos fenólicos totais (CFT) por Folin-Ciocalteau, e pelos métodos de redução do ferro (FRAP- "*Ferric Reducing Antioxidant Power*") e de sequestro do radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), revelaram que as três amostras de pimenta apresentaram maiores teores de CFT no estágio imaturo do primeiro ano, sendo que estes valores de fenólicos totais aumentaram com o amadurecimento

das pimentas. Verificou-se também a existência de correlações positivas entre os resultados de CFT e os métodos de ação antioxidantes, sendo que, esta correlação foi maior para o método de FRAP do que para o de DPPH[•], provavelmente em função das particularidades de estereoquímica destes ensaios antioxidantes.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados aqui apresentados sugere-se as seguintes investigações considerando os diferentes estádios de maturação das amostras:

- Empregar as metodologias desenvolvidas e otimizadas de SPME e GC/MS em associação a métodos sensoriais, para investigar a importância odorífica e sua relação com a qualidade das pimentas *Capsicum*.
- Identificar e quantificar os flavonóides presentes nas amostras e qual a influencia da maturação sobre estes.
- Identificar e quantificar os capsaicinóides das pimentas e qual a influencia da maturação sobre estes.
- Investigar quais os carotenóides presentes nas amostras, em que quantidade e qual a influencia da maturação sobre estes.
- Empregar, para as amostras, outros métodos de avaliação de potencial antioxidante com mecanismos de ação diferentes dos empregados nesse trabalho.
- Realizar ensaios *in vivo* a fim de verificar os efeitos antioxidantes das pimentas em organismos biológicos.