



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PATRICIA TONON DE SOUZA

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA INDIRETA DE
CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a ADRIANA VITORINO ROSSI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR PATRICIA TONON DE SOUZA, E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a ADRIANA VITORINO ROSSI**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

So89d Souza, Patricia Tonon de (1985-).
 Determinação espectrofotométrica indireta de
 capsaicinóides em pimentas / Patricia Tonon de Souza. –
 Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Capsaicinóides. 2. Pimentas. 3. Quantificação
espectrofotométrica. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Indirect spectrophotometric determination of capsaicinoids in peppers

Palavras-chave em inglês:

Capsaicinoids

Peppers

Spectrophotometric quantification

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Adriana Vitorino Rossi [Orientadora]

Matthieu Tubino

Daniela Brotto Lopes Terci

Data de defesa: 02/05/2012

Programa de pós-graduação: Química

*“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo,
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe dentro de você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, camínhe.
Quando não conseguir camínhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha.”*

...

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

*Dedico este trabalho aos meus pais Vicente e Ana Lúcia
pelo incentivo, apoio, dedicação e amor incondicional.*

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o reconhecimento por um benefício recebido, a sensação de saber que recebeu algo muito precioso, é como um sorriso interno, muito gostoso. Diante desta sensação, dizer “obrigada” é o mínimo que podemos fazer.

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos recebidas em minha trajetória.

À professora Adriana pela paciência, apoio, dedicação, conversas e conselhos profissionais e pessoais, desde a Iniciação Científica. Obrigada por sua amizade Dri!

À Acácia, nossa técnica e amiga, sempre dedicada e atenciosa. Um verdadeiro anjo do GPQUAE. Obrigada pela paciência e amizade Acá!

Aos amigos do GPQUAE pelas conversas, confraternizações, momentos de descontração, cafezinhos, companheirismo e amizade: professor Tubino, Martha, Gustavo, Patrícia, Aline, William, Surayya, Luís Francisco, Juliana, Sabir, Adriano, Nathássia, Rodrigo, Geraldo, Flávio, Eva, Lília e Marta.

Em especial à Martha, por toda amizade, companheirismo, conselhos e socorros prestados. Obrigada por tudo Má!

Aos amigos do EXTRAE por todo apoio e compreensão nas horas em que tive de escapar do trabalho na FEA para fazer experimentos no IQ e, também, pelo companheirismo diário e momentos de diversão: professor Tonzé, professor Eduardo, professor Cabral, Paulo, Camila, Losiane, Mariana, Maitê, Taiana, Marina, Rodrigo, Telma, Luciana, Marcela, Irede, Natália, Larissa, Rafael, Guilherme, Fábio, Simone e Klícia.

Ao Cyro Abumussi da Fazenda Ituaú pelas pimentas doadas e conversas muito interessantes a respeito. Muito obrigada Cyro!

À professora Solange Cadore pela doação do reagente PAR.

À CPG-IQ/UNICAMP pela verba destinada à compra das mudas de pimenteiras.

Aos professores do IQ-UNICAMP, que contribuíram para minha formação.

À Livia do Herbário do IB pelo registro das exsiccatas das pimenteiras.

A todo o corpo de funcionários do IQ, em especial: ao Ricardo do HPLC, obrigada por cada uma das diversas amostras e replicatas; à Rita do MS, obrigada pela busca minuciosa dos capsaicinóides; à Márcia do IV, obrigada por testar todas as opções possíveis mesmo

que não tenham dado certo; à Bel da CPG por toda atenção e orientação no esclarecimento das dúvidas quanto ao programa; e a todos os funcionários do IQ, que de uma forma ou de outra contribuem para o bom funcionamento deste Instituto maravilhoso.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos, mais que especiais, por toda amizade, grupos de estudos, festas e diversões: Nathy, Theta, Heitor, Trinca, Puro Osso, Helton, Marcela, Tintim, Tati, Bruna e Valeska.

Aos meus pais Vicente e Ana Lúcia pela idéia inicial deste trabalho e por todo amor que sempre me dedicaram. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, por serem meus melhores amigos, por toda preocupação, educação e valores. Pelo empenho em me ajudar neste trabalho. Meu amor por vocês é incondicional!

À minha irmã Priscila e ao meu sobrinho Leonardo. Amo vocês!

E, por último, mas não menos importante, ao Leonardo Biancão, que desde o final de minha graduação se dedica incondicionalmente pelas “viagens” Joaquim Egídio - Barão Geraldo. Obrigada por todo apoio, incentivo, amor, carinho e paciência. Por também fazer parte do trabalho árduo com as pimentas, com certeza o trabalho mais pesado. Obrigada por seus cuidados, te amo muito!

Esse trabalho é o marco de mais uma etapa cumprida em minha vida, um sonho realizado e ensinamentos aprendidos. Obrigada a todos que compartilharam comigo, quer seja de uma pequena parte ou do trabalho todo, durante estes dois anos de mestrado.

Minha eterna gratidão!

Patrícia Tonon de Souza

CURRÍCULO DA AUTORA

PATRICIA TONON DE SOUZA

- Graduação – *Bacharelado em Química*

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão:* 07/2009

TRABALHOS DESENVOLVIDOS EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Elaboração e execução do trabalho *“Otimização de Reação Colorimétrica para Quantificação de Tiabendazol por Procedimento de Baixo Custo”* Período: julho/2006 a fevereiro/2008. Bolsista FAPESP. Orientação: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi
- Elaboração e execução do trabalho *“Estratégias Biotecnológicas para Obtenção de Renováveis”*. Período: abril/2008 a agosto/2009. Bolsista do Instituto Uniemp. Orientação: Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- *“Otimização de Reação Colorimétrica para Quantificação de Tiabendazol por Procedimento de Baixo Custo”* no XV CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 2007.
- *“Otimização de Reação Colorimétrica para Quantificação de Tiabendazol por Procedimento de Baixo Custo”* na 31ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2008.
- *“Extração e Estabilidade de Capsaicinóides de Pimentas do Gênero Capsicum”* na 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011.
- *“Quantificação de Antocianinas em Extratos de Frutas com Medidas Colorimétricas em Dispositivo Portátil”* no 16º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, 2011.
- *“Formação Continuada e Atividade de Extensão em Foco: “Comida, Vida e Química” para Integrar Professores, Estudantes e Pesquisadores”* na 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Profissional de Apoio à Pesquisa e Extensão; função: Químico, como servidor público da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas SP, de fevereiro/2011 a atual, 40 horas semanais, no Laboratório de Extração Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio – EXTRAE, no Departamento de Engenharia de Alimentos – DEA, da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA.

ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES

- Participação na – III Semana Acadêmica de Farmácia da UNICAMP – “Biotecnologia em Organismos Geneticamente Modificados e Proteção Intelectual” – FCM-UNICAMP, 15 a 19/agosto/2008.
- Participação na – VII Semana de Química – “A Química do dia-a-dia” – IQ-UNICAMP, 1 a 4/setembro/2008.
- Monitora no projeto: *“Isolamento e Avaliação da Produção de Antibióticos por Linhagens de Streptomyces”* na VII Edição do Programa Ciência e Arte nas Férias, UNICAMP, 09/janeiro a 06/fevereiro/2009, no Instituto de Química – IQ UNICAMP.
- Monitora no Projeto: *“Quantificação de Antocianinas em Extratos de Frutas com Medidas Fotométricas em Dispositivo Portátil”* no Programa de Iniciação Científica Júnior - UNICAMP/CNPq 2010. Período: 17/maio/2010 a 15/abril/2011.
- Monitora no IX SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ): *“Comida, Vida e Química”*. Período: 5 e 6/novembro/2010, no Instituto de Química – IQ UNICAMP.

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1510874433921718>

RESUMO

“DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA INDIRETA DE CAPSAICINÓIDES EM PIMENTAS”

Autora: Patricia Tonon de Souza

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Vitorino Rossi

Capsaicinóides (CAPS) são substâncias responsáveis pela pungência em pimentas do gênero *Capsicum*. Quantificar CAPS é relevante devido às aplicações desses compostos na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, além do uso em armas químicas. Nesse trabalho, foi desenvolvido método espectrofotométrico baseado na reação colorimétrica entre CAPS, Co^{2+} e 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR, para quantificação de CAPS totais (C_{CAPS}) em diversas espécies de *Capsicum*. O produto da reação tem proporção estequiométrica $\text{Co}^{2+}:\text{PAR}:\text{CAPS}$ 1:2:2 e absorção em 510 nm proporcional a C_{CAPS} . A curva analítica apresentou faixa linear entre 0,001 e 0,03 U, limite de detecção = 0,0004 U e limite de quantificação = 0,0005 U (U = mg CAPS/g pimenta) e coeficiente de correlação = 0,9979. Os resultados foram comparados com o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e não apresentaram diferença significativa com 95% de confiança, além disso, ambos resultados são coerentes com as escalas organolépticas disponíveis na literatura. No aperfeiçoamento das condições para obtenção de extratos etanólicos de CAPS, estabeleceu-se o uso de cachaça (teor alcoólico 39%), proporção pimenta:cachaça 30:50 g/mL e agitação de 30 min. O estudo da conservação dos extratos indicou que é favorável armazená-los a 6 °C, a estocagem das pimentas *in natura* a -11 °C por até três meses não leva a perda significativa de CAPS e a C_{CAPS} aumenta a medida que o estágio de maturação da pimenta é completado.

Palavras-chaves: capsaicinóides, pimentas, quantificação espectrofotométrica.

ABSTRACT

"INDIRECT SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CAPSAICINOIDS IN PEPPERS"

Author: Patricia Tonon de Souza

Adviser: Prof.^a Dr.^a Adriana Vitorino Rossi

Capsaicinoids (CAPS) are substances responsible for pungency in *Capsicum*. CAPS is relevant to quantify due to the applications of these compounds in food, pharmaceutical and cosmetic industries, and the use of chemical weapons. In this work, we developed a spectrophotometric method based on the colorimetric reaction between CAPS, Co^{2+} and 4 - (2-pyridylazo)resorcinol, PAR, for quantification of total CAPS (C_{CAPS}) in several species of *Capsicum*. The product of the reaction is stoichiometric Co^{2+} :PAR:CAPS 1:2:2 and absorption at 510 nm proportional to C_{CAPS} . The analytical curve linear range between 0,001 and 0,03 U, detection limit = 0,0004 and limit of quantification U = 0,0005 U (U = mg CAPS/g pepper) and correlation coefficient = 0,9979. The results were compared with the method of high performance liquid chromatography (HPLC) and not significantly different at 95% confidence, moreover, both results are consistent with the organoleptic scales available in the literature. The improvement of conditions for obtaining ethanol extracts of CAPS, established the use of cachaça (alcohol content 39%), proportion pepper:cachaça 30:50 g/mL and stirred for 30 min. The study of the conservation of the extracts indicated that it supports storing them at 6 °C, the storage of *in nature* peppers at -11 °C for up to three months does not lead to significant loss of CAPS and C_{CAPS} increases as the stage of maturation of pepper is added.

Keywords: capsaicinoids, peppers, spectrophotometric quantification.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
PREFÁCIO	xxix
Capítulo 1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Pimentas <i>Capsicum</i>	3
1.1.1. Pimentas <i>Capsicum annuum</i>	5
1.1.2. Pimentas <i>Capsicum baccatum</i>	6
1.1.3. Pimentas <i>Capsicum chinense</i>	6
1.1.4. Pimentas <i>Capsicum frutescens</i>	8
1.1.5. Pimentas <i>Capsicum pubescens</i>	8
1.2. Capsaicinóides (CAPS)	8
1.2.1. Capsaicina (CAP).....	10
1.3. Extração de CAPS.....	11
1.4. Quantificação de CAPS.....	12
1.5. PAR	15
Capítulo 2. OBJETIVOS	17
Capítulo 3. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1. Considerações Gerais	23
3.2. Reagentes, Materiais e Equipamentos	23
3.2.1. Reagentes.....	23
3.2.2. Materiais e Equipamentos.....	24
3.3. Procedimentos.....	24
3.3.1. Registros das exsicatas das pimenteiras	24

3.3.2.	Adaptação do Método Oficial para Quantificação de CAPS	25
3.3.3.	Obtenção e Armazenamento de Extratos de CAPS.....	26
3.3.3.1.	Obtenção e Armazenamento de Extratos Etanólicos	26
3.3.3.2.	Aperfeiçoamento da Extração de CAPS em Cachaça.....	27
3.3.4.	Monitoramento das Pimentas Armazenadas sob -11 °C.....	28
3.3.5.	Estudo Comparativo do Estágio de Maturação das Pimentas	28
3.3.6.	Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico	28
3.3.6.1.	Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR ₂ com Controle de pH..	28
3.3.6.2.	Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR ₂ em Cachaça.....	29
3.3.6.3.	Construção da Curva Analítica	30
3.3.6.4.	Comparação de Resultados de Quantificação	30
3.3.6.5.	Estequiometria da espécie CoPAR ₂ CAPS _n	30
3.3.6.6.	Estudo da existência da espécie CoPAR ₂ CAPS ₂	31
Capítulo 4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	Registros das exsicatas das pimenteiras.....	35
4.2.	Adaptação do Método Oficial para Quantificação de CAPS	36
4.3.	Obtenção e Armazenamento de Extratos de CAPS	43
4.3.1.	Obtenção e Armazenamento de Extratos Etanólicos.....	43
4.3.2.	Aperfeiçoamento da Extração de CAPS em Cachaça	54
4.4.	Monitoramento das Pimentas Armazenadas sob -11 °C	54
4.5.	Estudo Comparativo do Estágio de Maturação das Pimentas.....	56
4.6.	Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico	57
4.6.1.	Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR ₂ com Controle de pH	57
4.6.2.	Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR ₂ em Cachaça	64
4.6.3.	Construção da Curva Analítica	66
4.6.4.	Comparação de Resultados de Quantificação.....	68
4.6.5.	Estequiometria da Espécie CoPAR ₂ CAPS _n	70

4.6.6. Estudo da Existência da Espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$	72
Capítulo 5. CONCLUSÕES	77
Capítulo 6. TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	81
Capítulo 7. PERSPECTIVAS.....	85
Capítulo 8. REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	97
Anexo 1: Etiquetas dos registros das exsiccatas das pimentas	99
Anexo 2: Testes estatísticos.....	107
Teste Q	107
Teste F	107
Teste t	108
Teste t pareado	108
Anexo 3: Método da variação contínua	111

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP: capsaicina

CAPS: capsaicinóides

C_{CAPS}: concentração inicial de CAPS em solução (mg de CAPS/g de pimenta)

C_M: concentração inicial de M em solução (mol/L)

CoPAR₂CAPS₂: espécie cromófora de proporção estequiométrica estabelecida

CoPAR₂CAPS_n: espécie cromófora formada entre o complexo CoPAR₂ e CAPS

C_{PAR}: concentração inicial de PAR em solução (mol/L)

Cu+CAPS: misturas de Cu²⁺ e CAPS

CuPAR₂CAPS_n: espécie cromófora formada entre o complexo CuPAR₂ e CAPS

DHCAP: dihidrocapsaicina

GC: cromatografia gasosa

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HCAP: homocapsaicina

HDHCAP: homodihidrocapsaicina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

M: cátion de metal de transição, que pode ser Ni²⁺, Co²⁺ ou Cu²⁺

M+CAPS: misturas metal de transição com CAPS

MPAR₂: complexos de metal de transição com o ligante PAR

NCAP: norcapsaicina

NDHCAP: nordihidrocapsaicina

NiPAR₂CAPS_n: espécie cromófora formada entre o complexo NiPAR₂ e CAPS

NNCAP: nornorcapsaicina

NNDHCAP: nornordihidrocapsaicina

PAN: 1-(2-piridilazo)-2-naftol

PAR: 4-(2-piridilazo)resorcinol

PAR+CAPS: misturas de PAR e CAPS em solução

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UHPLC-MS: cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

ε: absorvidade molar

λ_{máx}: comprimento de onda de máxima absorção

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de complexos de PAR (FLASCHKA e BARNARD, 1972).	16
Tabela 2. Informações de condições do estudo da estabilidade dos extratos.	27
Tabela 3. Composição e pH de tampões, onde OAc representa acetato.....	28
Tabela 4. Concentrações finais de CoPAR ₂ estudadas.	30
Tabela 5. Números dos registros de exsiccatas obtidos para as pimenteiras <i>Capsicum</i> (C.).	35
Tabela 6. Dados para a interpretação dos espectros de massas das Figuras 17 a 19 (PRUTHI, 2003).....	37
Tabela 7. Resultados das amostras de DHCAP quantificadas por HPLC.....	42
Tabela 8. Dados obtidos para o aperfeiçoamento do método de extração.	54
Tabela 9. C _{CAPS} em pimenta dedo-de-moça armazenada em -11 °C.....	55
Tabela 10. C _{CAPS} em diferentes estágios de maturação dos frutos <i>Capsicum</i> , por método HPLC.	56
Tabela 11. Quantificação dos extratos de pimentas <i>Capsicum</i> e dados da literatura.	69
Tabela 12. C _{CAPS} em pimentas <i>Capsicum</i> e valores calculados para teste F e teste <i>t</i> pareado.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flores de pimenteiras <i>Capsicum</i>	4
Figura 2. Pimentas <i>Capsicum annuum</i> . A – pimenta culiacan, B – pimenta serrano e C – pimenta guajillo.....	6
Figura 3. Pimenta cumari (<i>Capsicum baccatum</i>).	6
Figura 4. Pimenta Bhut Jolokia (<i>Capsicum chinense</i>). Atualmente, a pimenta <i>Capsicum</i> mais picante do mundo, obtida por cruzamentos e originária da Índia.....	7
Figura 5. Pimentas murupi (<i>Capsicum chinense</i>). A – pimenta murupi da Amazônia golden, B – pimenta murupi da Amazônia, C – pimenta murupi vermelha e D – pimenta murupi laranja.....	7
Figura 6. Pimentas <i>Capsicum chinense</i> . A – pimenta pitanga, B – pimenta saco e C – pimenta balão.	7
Figura 7. Pimenta malagueta (<i>Capsicum frutescens</i>).	8
Figura 8. Pimenta Rocoto (<i>Capsicum pubescens</i>).	8
Figura 9. Estrutura molecular típica de capsaicinóides, onde R representa cadeias carbônicas alifáticas que podem ser substituídas.....	9
Figura 10. Estruturas dos CAPS mais comuns presentes em pimentas <i>Capsicum</i>	10
Figura 11. Esquema geral do canal iônico TRPV1 sob ação da CAP, adaptado de BINSHTOK, BEAN e WOOLF, 2007.....	11
Figura 12. Figura ilustrativa da escala de temperatura ou Julie Cohn.	13
Figura 13. Estrutura molecular do quelante 4-(2-piridilazo)resorcinol – PAR.	15
Figura 14. Estrutura do complexo de Co^{2+} com PAR em solução aquosa, indicado por CoPAR_2	16
Figura 15. Exemplo da etiqueta de registro de exsicata das pimenteiras no Herbário UEC..	36
Figura 16. Cromatogramas do padrão de DHCAP 0,5 mg/mL, extrato de pimenta dedo-de-moça – DM e extrato de pimenta de-cheiro-do-Pará – CH.....	36
Figura 17. Espectros de massas da solução de padrão DHCAP preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram DHCAP (308 m/z), CAP(306 m/z), NDHCAP (294 m/z) e HCAP (320 m/z).....	38
Figura 18. Espectros de massas da solução de extrato de pimenta de-cheiro-do-Pará preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram DHCAP (308 m/z), CAP (306 m/z) e HDHCAP (322 m/z).	39

Figura 19. Espectros de massas da solução de extrato de pimenta dedo-de-moça preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram CAP (306 m/z), NDHCAP (294 m/z), HCAP (320 m/z) e HDHCAP (322 m/z).....	40
Figura 20. Espectro eletrônico do padrão de DHCAP 1×10^{-4} mol/L em etanol absoluto, solvente usado também como branco.	41
Figura 21. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta de-cheiro-do-Pará e pimenta biquinho diluídos 10 vezes em cachaça, solvente usado também como branco.....	42
Figura 22. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta bode armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol absoluto , etanol 90% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	43
Figura 23. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol 70%, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	44
Figura 24. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol 90%, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	44
Figura 25. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol absoluto, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.....	45
Figura 26. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta balão armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol absoluto , etanol 90% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	46
Figura 27. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta saco armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol absoluto , etanol 90% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	46

Figura 28. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta bode armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol 90% , etanol 80% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	47
Figura 29. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 70%, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.....	48
Figura 30. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 80%, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.....	48
Figura 31. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 90%, sendo as cores referentes a 330 , 420 , 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.....	49
Figura 32. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta cumari armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol 90% , etanol 80% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	49
Figura 33. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta pitanga armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando etanol 90% , etanol 80% e etanol 70% em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	50
Figura 34. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39% e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: extratos frescos , 1 , 2 , 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	51
Figura 35. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39%, diluídos 5 vezes e armazenados por 4 meses. As cores são	

referentes à idade dos extratos: extratos frescos, 1, 2, 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	51
Figura 36. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39%, diluídos 10 vezes e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: extratos frescos, 1, 2, 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	52
Figura 37. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando etanol de uso doméstico 46 °INPM e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: extratos frescos, 1, 2, 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.	52
Figura 38. Espectros de extratos de pimenta dedo-de-moça na proporção pimenta:cachaça 30:50 g/mL diluídos 5 vezes, utilizando cachaça como branco.	55
Figura 39. Espectros eletrônicos das soluções de CAPS e PAR e da mistura PAR+CAPS, em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão borato pH 8,35 na proporção de 50:50 v/v. O branco utilizado foi aguardente:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.	58
Figura 40. Espectros eletrônicos das soluções de CAPS e Cu^{2+} e da mistura Cu^{2+} +CAPS, em tampão acetato pH 3,78, sendo $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 50:50 v/v. O branco utilizado foi cachaça:solução aquosa pH 3,78 na proporção 15:85 v/v. A absorbância negativa do espectro de Cu^{2+} ocorreu devido ao uso do branco errado.	58
Figura 41. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Ni^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.	59
Figura 42. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 7,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Ni^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em	

tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 7,35 na proporção 15:85 v/v.60

Figura 43. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.60

Figura 44. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 9,04, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 9,04 na proporção 15:85 v/v.61

Figura 45. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 9,04, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 9,04 na proporção 15:85 v/v.61

Figura 46. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão amônia pH 10,24, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 10,24 na proporção 15:85 v/v.62

Figura 47. Espectros das misturas $CoPAR_2 + CAPS$ em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 0,5, 1, 2,5, 5$ e $7,5$ mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10 g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 80:20 v/v. Branco: cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 24:76 v/v.63

Figura 48. Espectros das misturas $CuPAR_2 + CAPS$ em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Cu^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 0,5, 1, 2,5, 5$ e $7,5$ mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:caçaça 1:10

g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 80:20 v/v. Branco: cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 24:76 v/v.	63
Figura 49. Espectros eletrônicos das misturas de soluções nas seguintes concentrações: $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{CAPS} = 0,024$ mg CAPS/g pimenta (final). O branco utilizado foi mistura cachaça:água 92:8 v/v.	64
Figura 50. Absorbância em 510 nm em função de C_{CAPS} para as misturas $CoPAR_2 + CAPS$ e $PAR + CAPS$, onde: $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{CAPS} = 0,0048$ a $0,048$ mg CAPS/g pimenta (final). Branco: cachaça:água na proporção 92:8 v/v.	65
Figura 51. Espectros eletrônicos de $CoPAR_2$ em diferentes concentrações. Branco: cachaça:água na proporção 92:8 v/v.	66
Figura 52. Espectros eletrônicos das misturas de $CoPAR_2 + CAPS$ com as seguintes concentrações finais: $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L e C_{CAPS} de 0,0003 a 0,6000 mg CAPS/g pimenta,. Branco: cachaça:água 92:8 v/v.	67
Figura 53. Curva analítica com as seguintes concentrações finais: $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L.	68
Figura 54. Dados para a determinação da estequiometria do complexo $CoPAR_2$ em cachaça pelo método da variação contínua, onde $C_{total} = C_{PAR} + C_{Co^{2+}}$	71
Figura 55. Dados para a determinação da estequiometria da espécie $CoPAR_2CAPS_n$ em cachaça pelo método da variação contínua, onde $C_{total} = C_{CAPS} + C_{[CoPAR_2]}$	72
Figura 56. Espectros eletrônicos para as misturas $CoPAR_2$ e $CoPAR_2CAPS_2$ em cachaça, com $C_{PAR} = 6,21 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{CAPS} = 1 \times 10^{-5}$ e 2×10^{-5} mol/L (final). O branco utilizado foi cachaça.	73
Figura 57. Espectros eletrônicos para as misturas $CoPAR_2$ e $CoPAR_2CAPS_2$, em álcool isoamílico, com $C_{PAR} = 6,21 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{CAPS} = 1 \times 10^{-5}$ e 2×10^{-5} mol/L (finais). O branco utilizado foi álcool isoamílico.	74
Figura 58. Proposta para a estrutura da espécie $CoPAR_2CAPS_2$, onde há interação por ligação de hidrogênio entre $CoPAR_2$ e CAPS.	75

PREFÁCIO

Pimentas do gênero *Capsicum* são originárias das Américas e têm importante papel na cultura popular mundial. Sua pungência é devida aos capsaicinóides (CAPS), alcalóides que se acumulam principalmente na vesícula da epiderme das pimentas e que são facilmente liberados quando os frutos sofrem algum dano físico. Alguns CAPS vêm sendo estudados para investigar seu potencial de ação terapêutica e vem sendo empregados para aplicações nas indústrias de alimentos, medicamentos e cosméticos, além de serem aplicados em armas químicas, como o *spray* de pimenta. A literatura traz diversos métodos para quantificar CAPS e indicar a pungência de pimentas, com grande destaque para a escala Scoville, método organoléptico criado em 1912, que, embora subjetivo, ainda é o melhor aceito para comparação de pimentas *Capsicum*.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método espectrofotométrico para quantificação de CAPS totais (C_{CAPS}) em diversas espécies de *Capsicum*, tendo sido priorizadas condições que garantissem a acessibilidade do método proposto. Todas as pimentas utilizadas foram devidamente identificadas e registradas em herbário, conforme tópicos 3.3.1 e 4.1.

Após diversos ensaios prévios, optou-se pela reação colorimétrica entre CAPS, Co^{2+} e 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR, em cachaça. Essa reação apresenta produto com absorção em 510 nm proporcional a C_{CAPS} , o qual foi estudado pelo método de variações contínuas para determinar sua proporção estequiométrica e com extrações líquido-líquido para comprovar sua existência, assuntos tratados nos tópicos 3.3.6 e 4.6. A validação laboratorial da metodologia espectrofotométrica foi feita comparando-se estatisticamente seus resultados com os obtidos pelo método oficial por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), relacionado nos tópicos 3.3.2 e 4.2.

Buscou-se aperfeiçoar um procedimento simples, com baixo custo e solventes pouco tóxicos para extração de CAPS, por agitação mecânica, o que é descrito nos tópicos 3.3.3 e 4.3.

Outro foco do trabalho envolveu o estudo da variação de C_{CAPS} durante os estágios de maturação das pimentas, o que pode ser acompanhado nos tópicos 3.3.5 e 4.5, e a avaliação de C_{CAPS} em pimentas armazenadas sob $-11\text{ }^{\circ}C$, nos tópicos 3.3.4 e 4.4.

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

1.1. Pimentas *Capsicum*

A palavra *Capsicum* tem origem na palavra grega “*kapto*”, que significa “*picar*”, e pimenta, no latim “*pigmentum*”, que significa “*corante*” (VASCONCELOS, 2011).

As pimentas e os pimentões *Capsicum* pertencem à família Solanaceae e são denominadas hortículas para diferenciá-las de outras pimentas que, diferente das *Capsicum*, chegam a formar árvores de médio porte, como a pimenta-do-reino ou pimenta-preta (*Piper nigrum* L., da família Piperaceae), a pimenta-rosa (*Schinus molle* L., da família Anacardiaceae) e a pimenta-da-jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl., da família Myrtaceae). Embora todas sejam tratadas como pimentas, nem todas têm parentesco e cada qual apresenta propriedades químicas distintas. Entre as *Capsicum*, os pimentões diferem das pimentas apenas por sua picância ou pungência reduzida, que muitas vezes nem chega a ser notada (CARVALHO *et al.*, 2006).

As espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* são originárias das Américas tendo sido primeiramente reportada no século XV por Chanca, um físico que acompanhou Colombo em sua segunda viagem para as Índias Ocidentais. Acredita-se que Colombo foi o primeiro europeu a conhecer a pimenta vermelha em uma de suas legendárias viagens à América, ao procurar uma fonte alternativa para a pimenta-do-reino, que naquela época era a pimenta favorita na Europa. Ele encontrou uma pequena vagem ardida que era muito usada pelos nativos americanos, a pimenta vermelha picante, que já no século XVII atingiu distribuição mundial (MACRAE, ROBINSON e SADLER, 1993).

O Brasil produz cerca de 40 mil toneladas ao ano de pimentas *Capsicum* obtidas em cerca de 2 mil hectares espalhados por quase todas as regiões. O negócio de pimentas é um importante segmento do mercado agrícola brasileiro, com forte expressão na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (CARVALHO *et al.*, 2006).

Na América do Sul, exceto no Brasil, algumas pimentas são chamadas de “*aji*”. A origem do nome vem de “*axi*”, do idioma indígena dos Arawaks; posteriormente, os espanhóis mudaram para “*aji*”. Alguns grupos de ameríndios da região dos Andes chamam a pimenta de “*uchu*” e “*huayca*”. Os mexicanos, de “*chile*”. A origem vem de “*chilli*” (do Náhuatl, dialeto dos astecas), palavra que era usada para “*pimenta*” e para compor outros nomes, como “*Chiltecpín*” ou “*Chiltepín*”, que significa “*pimenta pulga*”. Já os ameríndios usam “*chile*”,

“chile pepper”, “chili” ou “chili pepper”. Na Inglaterra usa-se “chile”. Em outros países de língua inglesa, “chilli” é o termo mais usado, exatamente como os astecas chamavam as *Capsicum* (VASCONCELOS, 2011).

O gênero *Capsicum* engloba cerca de 20 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação e cerca de 10 espécies silvestres. Diferentes espécies e variedades podem ser distinguidas por características morfológicas visualizadas principalmente nas flores (CARVALHO *et al.*, 2006), como indica a Figura 1. As pimentas já disseminadas pelos continentes são classificadas pelos botânicos em cinco espécies: as primeiras *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens*, depois *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens*. Essas três últimas passaram a liderar a comercialização atual. De todas as várias espécies conhecidas, essas cinco são as mais cultivadas (VASCONCELOS, 2011).



Figura 1. Flores de pimenteiras *Capsicum*.

A reprodução das espécies de *Capsicum* ocorre por autopolinização ou reprodução sexual, que é a união de células reprodutivas masculina e feminina na mesma flor. E, algumas espécies, permitem ainda a polinização cruzada de uma flor para outra de planta diferente, que pode ocorrer pela ação de insetos polinizadores, como as abelhas (VASCONCELOS, 2011).

A ardência ou picância ou pungência das pimentas do gênero *Capsicum* é enganosa, pois embora as pimentas pequenas sejam frequentemente associadas à maior ardência, as grandes nem sempre são as mais brandas (COUTER e BURRESON, 2006). Em todas as espécies de *Capsicum* os compostos químicos responsáveis pelo sabor pungente são os capsaicinóides. Os frutos *Capsicum* também contêm pigmentos coloridos, resina, proteína, celulose, pentosanas, elementos minerais, muito pouco de óleo volátil, responsável pelo

aroma característico e sabor do fruto fresco (BUTTERY *et al.*, 1969), e as sementes contêm óleo não volátil fixo (MANIRAKIZA, COVACI e SCHEPENS, 2003).

Por conterem compostos antioxidantes e serem ricas em flavonóides e em vitamina C, sugere-se que o consumo de pimentas *Capsicum* pode reduzir o risco de doenças crônicas como câncer de próstata, catarata e diabetes (LUNN, 2007). Há, também, informações sobre efeitos de inibição da coagulação do sangue, o que pode ser útil para tratar ou evitar doenças como trombose (LUNN, 2007).

O consumo regular de pimentas *Capsicum* influencia a liberação de endorfinas, mediadores químicos cerebrais responsáveis pela sensação de bem-estar e pela variação do bom-humor, estimulando o sistema nervoso simpático e o aumento da liberação de catecolaminas com conseqüente diminuição do apetite e ingestão de calorias. Isso indica que a pimenta pode ser útil em programas de controle de peso corporal (KASBIA, 2005 e ADAMS, 2007).

Um estudo realizado na Austrália em 2002 (AHUJA, 2006) apontou que o consumo regular de pimentão numa refeição ajudou a controlar o equilíbrio dos níveis de insulina em 60% do grupo de humanos estudado. Amostras de sangue foram analisadas para verificação dos níveis de glicose, insulina e do peptídeo C do soro. Os resultados apontaram uma redução dos níveis de glicose, estabilidade da insulina e menor secreção de peptídeo C, cuja elevação da taxa altera os níveis de glicose e insulina.

1.1.1. Pimentas *Capsicum annuum*

Nativas do Brasil, da Bolívia e do México representam a espécie mais cultivada comercialmente. Há milhares de variedades espalhadas pelo mundo, pois são de fácil cruzamento, incluindo-se os pimentões. Cruzam abundantemente com *chinense* e esporadicamente com *baccatum* e *frutescens* (VASCONCELOS, 2011).



Figura 2. Pimentas *Capsicum annum*. A – pimenta culiacan, B – pimenta serrano e C – pimenta guajillo.

1.1.2. Pimentas *Capsicum baccatum*

Conhecidas como “aji” na América do Sul, é nativa dos Andes (Perú e Bolívia) e cultivada no Brasil, na Argentina, na Colômbia, no Equador, no Perú, na Bolívia, na Índia, nos Estados Unidos e na Costa Rica. Cruzam esporadicamente com *annuum*, *chinense* e *frutescens* (VASCONCELOS, 2011).



Figura 3. Pimenta cumari (*Capsicum baccatum*).

1.1.3. Pimentas *Capsicum chinense*

Originárias da Bacia Amazônica, exceto a biquinho, têm as variedades mais ardidas do mundo. Cruzam abundantemente com *annuum* e esporadicamente com *frutescens* e *baccatum* (VASCONCELOS, 2011).



Figura 4. Pimenta Bhut Jolokia (*Capsicum chinense*). Atualmente, a pimenta *Capsicum* mais picante do mundo, obtida por cruzamentos e originária da Índia.

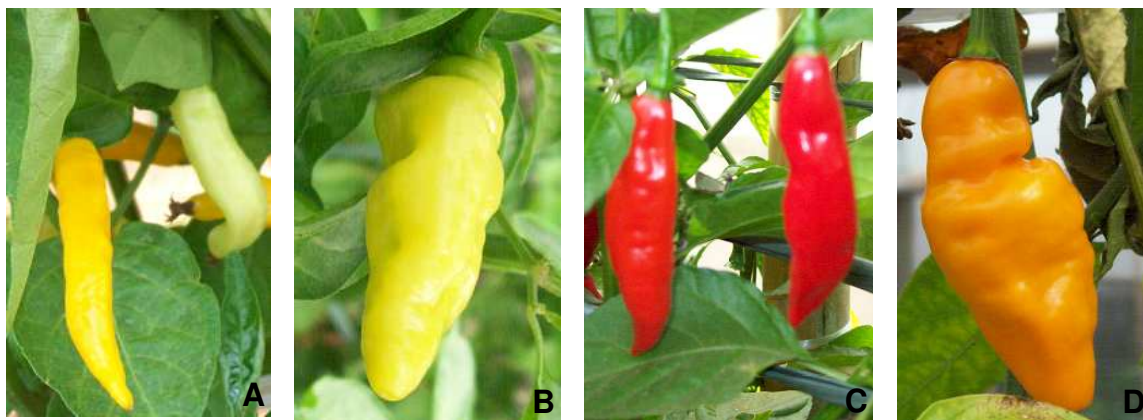


Figura 5. Pimentas murupi (*Capsicum chinense*). A – pimenta murupi da Amazônia golden, B – pimenta murupi da Amazônia, C – pimenta murupi vermelha e D – pimenta murupi laranja.



Figura 6. Pimentas *Capsicum chinense*. A – pimenta pitanga, B – pimenta saco e C – pimenta balão.

1.1.4. Pimentas *Capsicum frutescens*

Originárias da bacia Amazônica brasileira têm como variedades mais conhecidas a pimenta tabasco e a pimenta malagueta. Cruzam esporadicamente com *annuum*, *baccatum* e *chinense* (VASCONCELOS, 2011).



Figura 7. Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*).

1.1.5. Pimentas *Capsicum pubescens*

Originárias da região entre o Brasil e a Bolívia e cultivada na Colômbia, no Chile, na América Central e no México. Foi a primeira espécie domesticada nas Américas. Não cruzam com outras espécies (VASCONCELOS, 2011).



Figura 8. Pimenta Rocoto (*Capsicum pubescens*).

1.2. Capsaicinóides (CAPS)

Os compostos químicos responsáveis pelo sabor pungente e a ardência muitas vezes intensa das *Capsicum* são os capsaicinóides (CAPS) (MANIRAKIZA, COVACI e SCHEPENS, 2003), uma classe de compostos com estrutura comum apresentada na Figura 9.

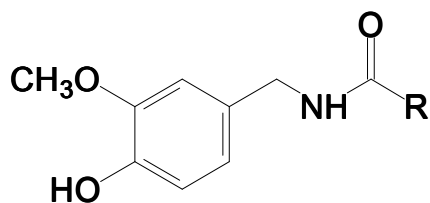


Figura 9. Estrutura molecular típica de capsaicinóides, onde R representa cadeias carbônicas alifáticas que podem ser substituídas.

A estrutura de CAPS tem um anel aromático com um grupo hidroxila fenólico e um grupo metóxi em posição *orto*. A pungência é grandemente elevada pela presença de um grupo amido ácido, o que para CAPS é a vanililamida. (KULKA, 1967; IWAI *et al.*, 1979; HAWER *et al.*, 1994; LASKARIDOU-MONNERVILLE, 1999; REILLY, CROUSH e YOST, 2001 e REILLY *et al.*, 2001).

CAPS são alcalóides, que são compostos de caráter básico, geralmente contendo heteroátomos de nitrogênio com caráter básico. A maioria dos alcalóides são heterocíclicos que, além de carbono, hidrogênio e nitrogênio, podem conter oxigênio, enxofre e raramente outros elementos como cloro, bromo e fósforo. Sua ocorrência é natural sendo encontrados principalmente em plantas, onde atuam em mecanismos de defesa. Também correspondem aos principais terapêuticos naturais com ação anestésica, analgésica, psicoestimulantes e neurodepressores (AMARAL, 1995 e Site IUPAC, 2012).

Os principais CAPS encontrados em pimentas *Capsicum* são capsaicina (CAP) e dihidrocapsaicina (DHCAP), representando 90% dos CAPS mais comuns (ZEWDIE e BOSLAND, 2001), alguns com estruturas apresentadas na Figura 10.

Esses alcalóides acumulam-se na vesícula da epiderme na parte interna do fruto, onde estão fixas as sementes, e também no interior das sementes, sendo liberados quando o fruto sofre algum dano físico (CARVALHO *et al.*, 2006). Os níveis de CAPS variam com o genótipo, maturidade e são influenciados pelas condições de crescimento e perda após o processamento (ZEWDIE E BOSLAND, 2001).

Composto	Grupo R	Estrutura comum	Composto	Grupo R
Nornorcapsaicina			Nornordihidrocapsaicina	
Norcapsaicina			Nordihidrocapsaicina	
Capsaicina			Dihidrocapsaicina	
Homocapsaicina			Homodihidrocapsaicina	

Figura 10. Estruturas dos CAPS mais comuns presentes em pimentas *Capsicum*.

1.2.1.Capsaicina (CAP)

Capsaicina (CAP) é uma substância com caráter vaso dilatador que tem sido utilizada na composição de medicamentos para uma variedade de condições neuropáticas de dor, incluindo neuralgia pós-terapêutica, neuropatia diabética dolorosa, osteoartrite, dor crônica pós-cirúrgica e síndrome *Guillain-Barré* (MARKOVITS e GILHAR, 1997 e SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Estudos relataram efeitos anti-carcinogênicos de CAP, causando parada do ciclo celular e induzindo a apoptose *in vitro* em diversos cânceres humanos (SURH, 2002, MALAGARIE-CAZENAVE *et al.*, 2009; e ANANDAKUMAR *et al.*, 2009).

A dose tóxica letal de CAP para uma pessoa de 70 kg é de 13 g, o que supera muito a quantidade contida em *Capsicum*, normalmente ingerida em uma refeição (PALECEK, SANT'AMBROGIO e SANT'AMBROGIO, 1989).

Outra pesquisa, do grupo de Clifford Woolf, com ratos, apontou que CAP pode atuar seletivamente, direcionando a ação de anestésicos para neurônios sensíveis a dor, sem atingir outras células neurológicas (BINSHTOK, BEAN e WOOLF, 2007).

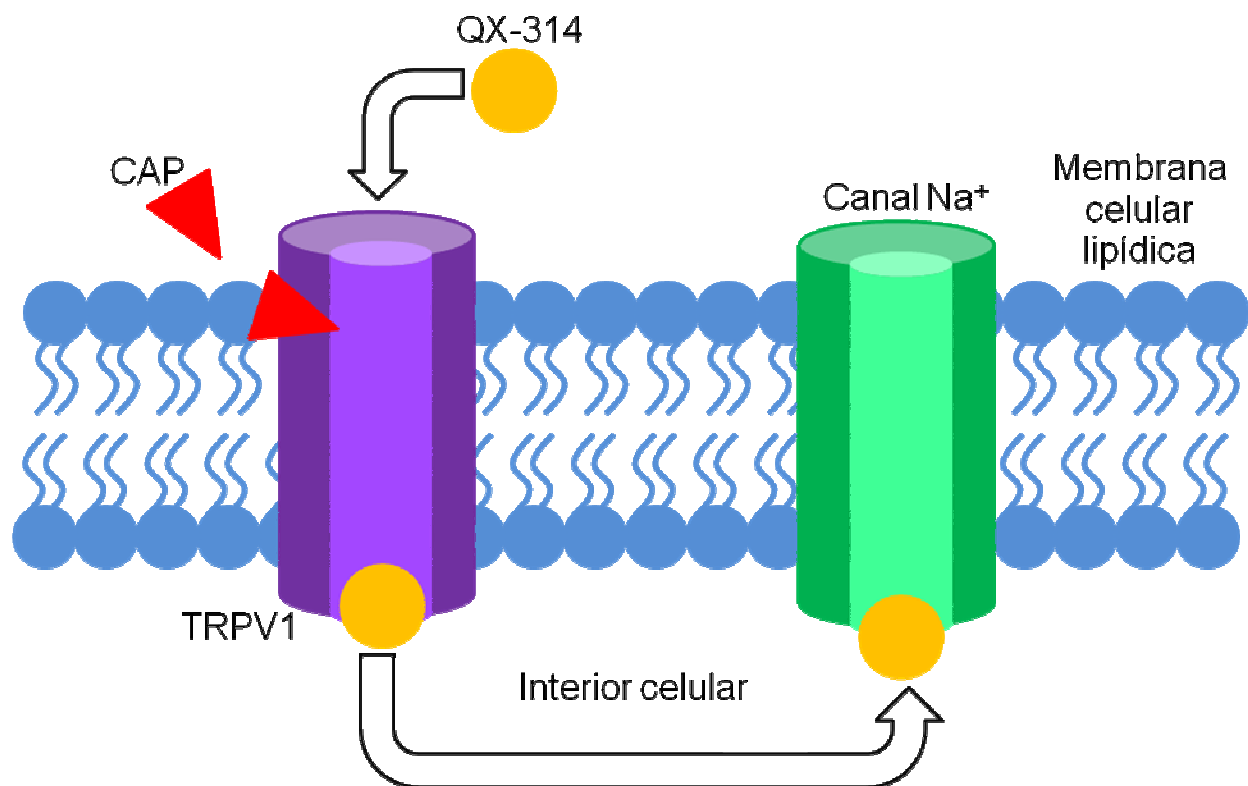


Figura 11. Esquema geral do canal iônico TRPV1 sob ação da CAP, adaptado de BINSHTOK, BEAN e WOOLF, 2007.

A Figura 11, ilustra a ação da CAP no canal iônico TRPV1. O anestésico QX-314 não consegue sozinho ultrapassar a membrana lipídica da célula. A CAP atua abrindo o canal iônico TRPV1 e, assim, o acesso do QX-314 ao interior da célula é permitido. Uma vez no interior da célula, o QX-314 pode ligar-se no canal de ação com Na⁺, onde exerce a ação anestésica local. Esta via de acesso transmembrana de QX-314 existe apenas em nociceptores, os neurônios sensíveis à dor, por isso sua ação não atinge as demais células neurológicas. Isso diminuiu efeitos colaterais pós-cirúrgicos e permitiu que os roedores respondessem ao toque e andassem normalmente mesmo sob efeito do anestésico (BINSHTOK, BEAN e WOOLF, 2007).

1.3. Extração de CAPS

Diversas técnicas são utilizadas para a extração de CAPS de pimentas: maceração (HUANG, MABURY e SAGEBIEL 2000 e KIRSCHBAUM-TITZE *et al.*, 2002), agitação mecânica (CONTRERAS-PADILLA e YAHIA, 1998), extração líquido-líquido (PERUCKA e

OLESZEK 2000), *soxhlet* (KOREL *et al.*, 2002), extração assistida por ultrason (KARNKA *et al.*, 2002; BARBERO *et al.*, 2008 e BOONKIRD, PHISALAPHONG e PHISALAPHONG 2008), extração por fluído supercrítico (YAO, NAIR e CHANDRA 1994, PEUSCH *et al.*, 1997 e DAOOD *et al.*, 2002;), extração por líquido pressurizado (BARBERO, PALMA e BARROSO 2006a), extração enzimática (SATAMARÍA *et al.*, 2000; SALGADO-ROMAN *et al.*, 2008) e extração assistida por microondas (BARBERO, PALMA e BARROSO 2006b).

Oleorresina é o termo usado para descrever extratos de CAPS obtidos a partir de um solvente específico e que podem ser desolventizados. Para aditivos alimentares, a melhor oleorresina de *Capsicum* contém os componentes responsáveis por cor e sabor (como pungência e aroma), que recriam, em formulações alimentícias, as qualidades sensoriais dos materiais frescos. A pureza e a quantidade residual de solvente devem estar em conformidade com as especificações das legislações alimentares pertinentes. (GOVINDARAJAN, 1986).

Uma outra aplicação de oleorresina é para produção de armas. A oleorresina *in natura* de pimenta é também acondicionada em *sprays* ou bombas de efeito moral em conjunto com uma espécie de óleo sintético para dificultar a remoção do produto. O gás de pimenta atua nas mucosas dos olhos, nariz e da boca causando irritação, ardor e sensação de pânico (VESALUOMA *et al.*, 2000).

1.4. Quantificação de CAPS

Dentre os métodos para a quantificação dos CAPS encontrados na literatura destacam-se os métodos organolépticos, que apesar da subjetividade inerente são amplamente aceitos como ponto de partida para a classificação das pimentas em escalas de picância (KOSUGE e FURUTA, 1970)

Em 1912, o farmacologista Wilbur L. Scoville, do laboratório americano Parke Davis, desenvolveu um teste para determinar “com precisão” o grau de pungência de diferentes variedades de *Capsicum*. Na versão atual desse teste organoléptico, cinco pessoas analisam a solução obtida a partir de uma massa conhecida de pimentas maceradas em álcool e diluídas com água. Quanto maior a pungência da amostra, maior a necessidade de diluição, até que a pungência deixe de ser sentida pelo provador. Assim, se é necessária uma diluição de 1.000 unidades de água para que não se note a picância de uma unidade do extrato

alcoólico da pimenta, a amostra é considerada com uma picância de 1.000 Unidades Scoville (SHU). Apesar da subjetividade inerente ao provador, até hoje, esse teste continua sendo um dos mais aceitos para determinar a pungência de pimentas (REIFSCHNEIDER, 2000, BONTEMPO, 2007, VASCONCELOS, 2011).

Há também outra escala para determinar a pungência de pimentas, conhecida como escala de temperatura, criada por Julie Cohn. Nessa escala, as pimentas têm sua pungência subjetivamente classificada de 1 a 10. Os graus 8, 9 e 10 são reservados às espécies de picância elevada; 4, 5, 6 e 7 indicam pimentas de média picância; enquanto 1, 2 e 3 indicam as variedades mais suaves. Uma amostra sem picância seria considerada classe zero. A Figura 12 ilustra uma escala Julie Cohn semelhante à encontrada em alguns produtos alimentícios que contêm pimenta e o nome escala de temperatura surgiu da semelhança de sua representação com um termômetro (LINGUANOTTO NETO, 2004).

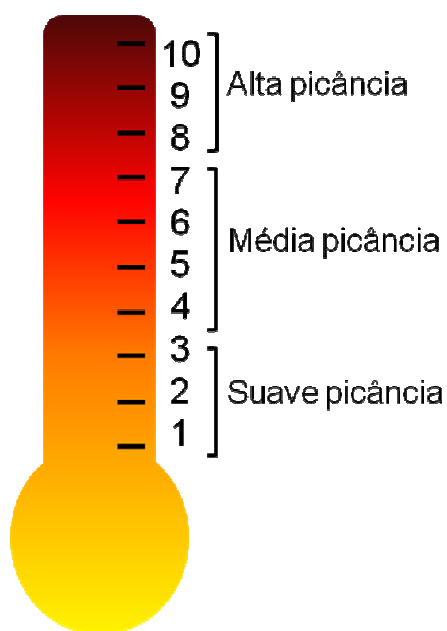


Figura 12. Figura ilustrativa da escala de temperatura ou Julie Cohn.

Além dos métodos organolépticos, há também métodos instrumentais envolvendo diversas técnicas comentadas na sequência.

Os métodos colorimétricos destacam-se devido à variedade de reagentes adicionados a extratos de CAPS para gerar produtos coloridos que podem ser relacionados à concentração de CAPS: sais de vanádio (TING e BARRONS 1942), vanilina (NORTH e BAYONNE, 1949), reagente *Folin Denis* (ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico) (BAJAJ. e KAUR, 1979 e BAJAJ, 1980), nitrito de sódio (AYAD, KHAYYAL e FARAG 1985), nitrito de sódio e molibdato de sódio (YANYING, 1988), cloreto férrico e ferricianeto de potássio (ANAN *et al.*, 1996), tungstato de sódio e ácido fosfomolibdico (MANDAL, POONAM e HORE 1998). Manirakiza *et al.* (2003) trazem uma interessante revisão de trabalhos com uso dos seguintes reagentes: VOCl_3 , reagente de *Folin Denis*, vanadato de amônio e ácido clorídrico, ácido diazobenzeno sulfônico e ácido sulfanílico. Apesar de toda diversidade desses reagentes colorimétricos, de modo geral são descritas dificuldades relacionadas com interferentes, reprodutibilidade dos resultados e/ou estabilidade do agente cromóforo, que subsidiaram estudos posteriores com modificações das propostas iniciais.

Com técnicas mais sofisticadas, há diversos métodos envolvendo cromatografia gasosa, GC, (IWAI *et al.*, 1979, KRAJEWSKA e POWERS, 1987), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS, (MANIRAKIZA, COVACI e SCHEPENS 1999, PEÑA-ALVAREZ, RAMÍREZ-MAYA e ALVORADO-SUÁREZ 2009), cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, (COOPER, GUZINSKI e FISCHER 1991, IWAI *et al.*, 1979) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, HPLC-MS (KOZUKUE *et al.*, 2005) para análise e/ou determinação de CAPS, porém, há dificuldades relevantes nas etapas de pré-concentração, purificação de reagentes e separação individual dos CAPS.

O método oficial para quantificar oleorresina de *Capsicum* emprega HPLC com detecção em 280 nm (USP, 2005).

Considerando alguns métodos de análise para CAPS descritos na literatura e as dificuldades e/ou alto custo inerentes, surgiu a idéia de desenvolver um método acessível para quantificar CAPS totais em extratos de pimentas *Capsicum*. Optou-se por buscar obter uma solução colorida e estável para medidas espectrofotométricas na região do visível para quantificar CAPS totais a partir do estudo da reação entre CAPS, 4-(2-piridilazo)resorcinol

(PAR) e um cátion de metal de transição (M). Nesse contexto inseriu-se o estudo espectrofotométrico das reações das misturas $\text{MPAR}_2 + \text{CAPS}$, $\text{PAR} + \text{CAPS}$ e/ou $\text{M} + \text{CAPS}$ ¹.

1.5. PAR

O ligante 4-(2-piridilazo)resorcinol, PAR, com estrutura molecular apresentada na Figura 13, é um sólido alaranjado e amorfo (massa molar = 255,21 g/mol), solúvel em água e álcool na faixa de 5 mg/100 mL a 10 °C, sendo mais solúvel em meio ácido ou alcalino (CHENG, UENO e IMAMURA 1982).

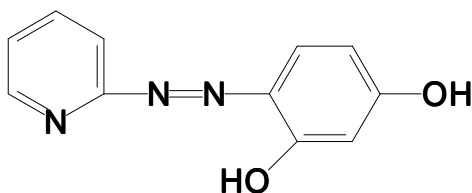


Figura 13. Estrutura molecular do quelante 4-(2-piridilazo)resorcinol – PAR.

Os complexos de PAR com cátions metálicos em geral são formados em proporção molar metal:ligante 1:1 e 1:2, sendo solúveis em água, com soluções de coloração intensa, geralmente vermelhas. O perfil do espectro eletrônico de soluções de PAR e seus complexos depende do pH do meio, por isso, as condições de pH, concentrações e proporções PAR e cátions, força iônica e composição de tampões devem ser selecionadas cuidadosamente (FLASCHKA e BARNARD, 1972). Um exemplo da estrutura molecular de complexo de PAR está ilustrado na Figura 14.²

¹ Para simplificar a redação, optou-se por indicar as misturas contendo CAPS, PAR e cátions metálicos de transição (Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Co^{2+}) como $\text{MPAR}_2 + \text{CAPS}$, onde M pode ser Ni^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} de acordo com o caso estudado e descrito.

² Dependendo do estado de oxidação do cátion e da proporção metal:ligante, o complexo formado pode apresentar diferentes cargas formais. Considerando que essa carga não é relevante para as questões discutidas neste trabalho, para efeito de simplificação da redação deste texto, os complexos serão representados sem indicação de carga.

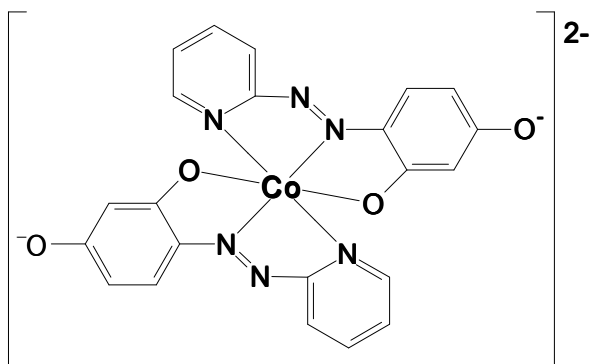


Figura 14. Estrutura do complexo de Co^{2+} com PAR em solução aquosa, indicado por CoPAR_2 .

Os complexos de PAR são solúveis em água, o que é vantajoso para uso em aplicações colorimétricas em comparação com outros quelantes, como o 1-(2-piridilazo)-2-naftol, PAN, que assim como seus complexos formados, são solúveis em solventes orgânicos (CHENG *et al.*, 1982).

A Tabela 1 traz algumas informações sobre complexos de PAR que orientaram o início de alguns testes desse trabalho.

Tabela 1. Dados de complexos de PAR (FLASCHKA e BARNARD, 1972).

Cátion Metálico	Proporção molar Metal:PAR	$\lambda_{\text{Máx}}$ (nm)	pH de complexação
Co^{2+}	1:2	510	8,25
			4,0
			4,8
			5,6
Cu^{2+}	1:1	522	2,3-5,0
	1:2	510	5,0
	1:1	517	3,2
Ni^{2+}	1:2	517	4,0
		494	9,3

Capítulo 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação laboratorial de um método espectrofotométrico para quantificar CAPS totais em pimentas *Capsicum*.

Os objetivos específicos foram:

→ Estudo da reação colorimétrica entre PAR, CAPS e cátions metálicos, incluindo uma investigação sobre a proporção estequiométrica do produto formado e o estudo da existência de uma nova espécie cromófora.

→ Validação laboratorial do método espectrofotométrico proposto.

→ Aperfeiçoamento da extração de CAPS para obter extratos com concentração suficiente de CAPS para a reação colorimétrica, com estabilidade adequada para armazenamento e baixa concentração de carotenóides (possíveis interferentes).

→ Avaliação da variação de C_{CAPS} durante os estágios de maturação das pimentas.

→ Estudo da variação de C_{CAPS} durante armazenamento das pimentas em $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Capítulo 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Considerações Gerais

Parte das pimentas foi adquirida da Fazenda Ituaú – Terra de gigantes, grande produtora de hortaliças, localizada em Salto-SP, na Rodovia do Açúcar. Outras variedades, mais comuns, foram compradas mudas no CEASA-Campinas, as quais foram cultivadas em sítio no distrito de Joaquim Egídio. Todas as pimentas foram coletadas 30 dias antes do uso, armazenadas em sacos plásticos, lacrados com fita crepe adesiva (3M) e identificados para estocagem em congelador doméstico (-11 °C). Alguns lotes de pimenta dedo-de-moça, utilizados como “padrão”, foram comprados no Mercado Municipal de Campinas e foram armazenados em refrigerador doméstico (6 °C) por no máximo 24 h até a utilização.

Para realização dos experimentos, porções necessárias de pimentas eram removidas do estoque e, após atingirem a temperatura ambiente, eram processadas com a retirada do pedúnculo e fino fatiamento com faca de aço, sem remoção das sementes para posterior utilização.

Registrou-se exsicata de cada amostra da Fazenda Ituaú e do sítio de Joaquim Egídio no Herbário UEC do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Os registros de Adriana Vitorino Rossi e Patrícia Tonon de Souza, junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) de atividades com finalidade científica envolvendo coleta e transporte de material botânico são 5092212 e 5102284 respectivamente.

3.2. Reagentes, Materiais e Equipamentos

3.2.1. Reagentes

Dihidrocapsaicina ~90% (Sigma), ácido acético glacial PA (Synth); água deionizada (Osmose reversa, Gehaka); metanol grau HPLC 99,9% (Tedia); etanol PA 99,5 % (Synth); álcool isoamílico PA 99,5 % (Synth); álcool etílico 46 °INPM (Zumbi); Cachaça Adoçada do Barril - 51[®], 39% vol. (Pirassununga); 4-(2-piridilazo)resorcinol, 99,98% (Merck), CoSO₄.7H₂O, 99,5% (Merck), CuSO₄.5H₂O, 99,5% (Merck) e NiSO₄.6H₂O, 99,5% (Merck); acetato de sódio, 99% (Sigma); H₃BO₃, 99,9% (Sigma); Na₂B₄O₇, 99,5 % (Merck); NaCl, 99,5 % (Sigma); NH₄Cl, 99,998 % (Sigma), solução de NH₃, 28-30% (Sigma), acetonitrila grau HPLC (Tedia), ácido fórmico PA 85% (Synth).

3.2.2. Materiais e Equipamentos

Espectrofotômetro (Biotech Pharmacia Ultrospech 2000) e cubetas de quartzo 1,0 cm de caminho óptico (Q4-Biocel); refrigerador doméstico com congelador (GE TMNF-E), cromatógrafo (Shimadzu Prominece, modelo SPD-M20A), detector com arranjo de diodos, coluna C18 (300×3,9 mm, 10 µm - µBondapak Waters); espectrômetro (UPLC-MS, modelo Acquity - triplo quadrupolo - TQD - Waters), coluna C18 (50×2,1mm, 1,7 µm, Acquity - UPLC®BEH – Waters); balança analítica (Mettler AX205 Delta Range) para dihidrocapsaicina, balança analítica (Shimadzu AX200) para líquidos, balança analítica (Quimis) para sólidos, pHmetro Analyser 300 e eletrodo de vidro Analion V620, capela laboratorial com vazão de 0,6 m/s e abertura de 20 cm; mesa agitadora de erlenmeyers (Nova Técnica, modelo CT-145), papel de filtro qualitativo (J. Prolab, gramatura 80 g/m² e espessura 205 µm), estufa até 90 °C (FANEM), corda para prensa, chapas de alumínio corrugado, prensa (grades de madeira), folhas de papelão e de jornal, vidraria de laboratório, programas Origin® 8.0 e Chemwin® 5.0.1 e câmera fotográfica Kodak® 8,2 MP.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Registros das exsiccatas das pimenteiras

Para essa identificação botânica, seguiu-se o procedimento padrão.

Foram cortados galhos de cerca de 20 cm das pimenteiras que deveriam conter folhas, flores e frutos e fez-se a devida identificação dos conjuntos, com informações dos nomes científicos e populares, formato, tamanho e cores dos frutos, flores e arbustos, utilidades das pimentas, entre outros.

O material foi levado para o Herbário UEC do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde os galhos foram cuidadosamente expostos em folhas de jornal tomando o cuidado para correta posição das flores e frutos (que quando muito grandes eram cortados ao meio). Para separação das diferentes espécies de pimentas, além das folhas de jornal, foram utilizadas folhas de papelão que eram intercaladas entre as mesmas. Ao final, era colocada uma folha de alumínio corrugado em cada extremidade do pacote de pimentas, seguidas das prensas de madeira para fixação do lote com corda.

O lote foi mantido em estufa aquecida a 50 °C por 3 dias para desidratação gradual do material fornecido. As pimentas foram, então, separadas do lote e cada espécie fornecida recebeu uma etiqueta com sua descrição e número de registro de exsicata do Herbário UEC.

3.3.2. Adaptação do Método Oficial para Quantificação de CAPS

O método oficial (USP 28, 2005) envolve análise por HPLC do extrato alcoólico e padrão de capsaicina (CAP) 0,5 mg/mL. O cromatograma da amostra não deve conter menos que 8% da área do cromatograma do padrão. A comercialização dos padrões de CAPS é controlada pelo Exército Brasileiro e pela Polícia Civil (Lista de Produtos Controlados, 2012) e não foi possível adquirir CAP, pois a UNICAMP não tinha autorização necessária. Optou-se por uma adaptação do método oficial com uso de DHCAP, único padrão de CAPS acessível para compra no momento. Para o cromatograma da amostra atingir 8% da área do cromatograma do padrão foram utilizados 1000 mg de extrato etanólico (em aguardente) de pimenta *Capsicum in-natura*, levando-se a mistura a 10 mL com metanol.

Seguindo o método, aplicaram-se as condições: coluna C18 (3,9 mm×30 cm, 10 µm), fase móvel metanol:ácido acético 2% 56:44 v/v, diluição isocrática, vazão 2 mL/min e detecção em 280 nm. Separadamente, injetaram-se 10 µL de solução padrão, aproximadamente 0,5 mg/mL, e depois 10 µL da amostra.

Os tempos de retenção relativos esperados eram aproximadamente 0,9 para nordihidrocapsaicina (NDHCAP), 1,0 para capsaicina (CAP) e 1,6 para dihidrocapsaicina (DHCAP) e a quantificação da amostra era dada pela Equação 1.

$$C_{CAPS} = \left(\frac{CP}{W} \right) \times \left(\frac{r_U}{r_S} \right) \quad \text{Equação 1}$$

onde: C_{CAPS} = %CAPS/mL; C = mg/mL do padrão de DHCAP; P = % pureza da DHCAP; W = mg da oleorresina utilizada no preparo da amostra, r_U = soma das áreas dos picos de CAP, DHCAP e NDHCAP e r_S = área do padrão de CAP.

A eluição dos CAPS não ocorreu como o esperado com relação aos tempos de retenção relativos e o número de picos eluídos. Portanto, para estabelecer uma relação matemática da quantificação de CAPS totais nas amostras pelo método HPLC, foram

determinadas a composição de CAPS das amostras e do padrão de DHCAP utilizado. Para isso, registraram-se espectros de massas dos compostos num sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detector de massas (UHPLC-MS), relacionando-se os resultados com os cromatogramas obtidos no sistema HPLC em uso regular. As condições utilizadas para UHPLC-MS foram: coluna C18 (2,1mm×5 cm, 1,7 µm), fase móvel água:acetonitrila 50:50 v/v, vazão 0,350 mL/min, temperatura de 30°C, volume de injeção 5 µL, voltagem de capilar 0,8 kV, cone 25 V, câmara de colisão 10 V, temperatura de dessolvatação 350 °C, vazão do gás do cone 100 L/h, vazão do gás de dessolvatação 800 L/h. O equipamento foi operado no modo MS-MS, com o primeiro quadrupolo no modo estático para as massas isotópicas dos principais CAPS, com fragmentação na câmara de colisão e análise dos fragmentos no segundo quadrupolo para comparar perfil de fragmentação e identidade dos íons moleculares em estudo. As amostras foram diluídas com ácido fórmico 0,1%:acetonitrila 50:50 v/v.

Como fonte de CAPS foram utilizados extratos de pimenta de-cheiro-do-Pará e pimenta dedo-de-moça, obtidos pela mistura de pimenta:cachaça na proporção 30:50 g/mL sob agitação mecânica durante 30 min, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min. Registraram-se espectros eletrônicos entre 190 e 800 nm de uma solução padrão de DHCAP 1×10^{-4} mol/L em etanol absoluto e dos extratos utilizados nesta etapa diluídos 10 vezes utilizando-se cachaça como solvente.

Para avaliar este método HPLC, duas amostras contendo 0,5 mg/mL do padrão de DHCAP foram quantificadas com injeções em triplicata.

3.3.3. Obtenção e Armazenamento de Extratos de CAPS

3.3.3.1. Obtenção e Armazenamento de Extratos Etanólicos

Para o aperfeiçoamento da obtenção de extratos etanólicos utilizou-se agitação mecânica para garantir a simplicidade e rapidez. Foram estudadas diferentes condições no preparo e armazenamento dos extratos, priorizando obter a menor quantidade de carotenóides, possíveis interferentes para reações colorimétricas.

Os extratos etanólicos de CAPS foram obtidos utilizando proporção massa de pimenta:volume de solvente 10:50 g/mL, sob agitação durante 20 min, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min para garantir uniformidade da extração, que ocorre ainda

durante o processo de filtração. Após filtração, a massa sólida de pimenta era descartada juntamente com o papel de filtro onde ficava retida e o extrato filtrado era armazenado em frasco de vidro âmbar. Testaram-se diferentes solventes: etanol absoluto, diluições do mesmo em água, etanol 46 °INPM (uso doméstico) e cachaça de teor alcoólico 39%. Diferentes alíquotas de cada extrato foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, parte mantida em armário à temperatura ambiente e outra sob refrigeração (6 °C) para estudo da estabilidade, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Informações de condições do estudo da estabilidade dos extratos.

Pimenta utilizada	Solvente	Diluição do extrato	Período de armazenamento a T ambiente	Período de armazenamento a 6 °C
BD, BL e SC	EtOH absoluto	-	-	5 meses
BD, BL e SC	EtOH:H ₂ O (90:10 v/v)	-	-	5 meses
BD, BL e SC	EtOH:H ₂ O (70:30 v/v)	-	-	5 meses
BD, CM e PG	EtOH:H ₂ O (90:10 v/v)	-	16 dias	-
BD, CM e PG	EtOH:H ₂ O (80:20 v/v)	-	16 dias	-
BD, CM e PG	EtOH:H ₂ O (70:30 v/v)	-	16 dias	-
BL	Cachaça (39%)	5 e 10 vezes	-	4 meses
BL	EtOH (46 °INPM)	-	-	4 meses

onde: T = temperatura, BD = pimenta bode, BL = pimenta balão, SC = pimenta saco, CM = pimenta cumari, PG = pimenta pitanga e EtOH = etanol.

Os espectros eletrônicos dos extratos foram registrados entre 190 e 850 nm, utilizando-se os solventes extratores como branco.

3.3.3.2. Aperfeiçoamento da Extração de CAPS em Cachaça

Após estabelecer a cachaça como melhor solvente extrator (item 3.3.3.1), foi realizado um estudo sobre a proporção mássica e tempo de agitação, priorizando obter extratos com concentração de CAPS suficiente para a reação colorimétrica com PAR e cátions metálicos, ou a maior possível, sem comprometer a rapidez do método de extração.

Utilizando-se pimenta de-cheiro-do-Pará foram testadas as proporções de extração pimenta:cachaça 10:50, 20:50 e 30:50 g/mL durante 30, 60 e 90 min de agitação, seguindo-se de filtração simples e repouso por 10 min. Os extratos obtidos foram quantificados pelo método HPLC com triplicatas de amostras injetadas e três repetições para corrida cromatográfica.

3.3.4. Monitoramento das Pimentas Armazenadas sob -11 °C

Foi investigada a variação de C_{CAPS} em pimentas armazenadas sob -11 °C. Frutos *in natura* maduros de pimenta dedo-de-moça foram divididos em 5 porções e mantidos em -11 °C. Então, durante 5 meses foram obtidos mensalmente extratos na proporção pimenta:cachaça 30:50 g/mL, sob agitação durante 30 min, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min. Os extratos tiveram seus espectros eletrônicos registrados entre 190 e 850 nm e foram quantificados pelo método HPLC com triplicatas de amostras injetadas e três repetições para corrida cromatográfica.

3.3.5. Estudo Comparativo do Estágio de Maturação das Pimentas

Foram obtidos extratos de oito pimentas *Capsicum* nos estágios verde, colorido e maduro, na proporção pimenta:cachaça 30:50 g/mL, com 30 min de agitação, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min.

Os extratos foram quantificados pelo método HPLC com triplicatas de amostras injetadas e três repetições para corrida cromatográfica.

3.3.6. Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico

3.3.6.1. Estudo da Influência de CAPS no Complexo $MPAR_2$ com Controle de pH

Estudou-se a complexação de PAR com os cátions metálicos Ni^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} e a influência da adição de CAPS nas reações em diferentes sistemas tamponados, sempre visando obter variações do perfil espectral na região visível do espectro. A Tabela 3 descreve os tampões utilizados, preparados de acordo com Perrin e Dempsey (1979) e o ajuste do pH com uso de pHmetro.

Tabela 3. Composição e pH de tampões, onde OAc representa acetato.

Tampão	pH estimado	pH obtido
44 mL HOAc (0,2 mol/L) + 6 mL NaOAc (0,2 mol/L) + 50 mL H ₂ O	3,8	3,78
4,8 mL HOAc (0,2 mol/L) + 45,2 mL NaOAc (0,2 mol/L) + 50 mL H ₂ O	5,6	5,55
10 mL Na ₂ B ₄ O ₇ (0,05 mol/L) + 90 mL H ₃ BO ₃ (0,2 mol/L) + 270 mg NaCl	7,44	7,35
45 mL Na ₂ B ₄ O ₇ (0,05 mol/L) + 55 mL H ₃ BO ₃ (0,2 mol/L) + 210 mg NaCl	8,43	8,35
90 mL Na ₂ B ₄ O ₇ (0,05 mol/L) + 10 mL H ₃ BO ₃ (0,2 mol/L) + 70 mg NaCl	9,08	9,04
70g NH ₄ Cl + 570 mL NH ₃ e diluição até 1L com água destilada	10,0	10,24

*OAc = íon acetato

Pimenta dedo-de-moça foi a fonte de CAPS para extratos com proporção pimenta:cachaça 30:50 g/mL, obtidos sob agitação durante 30 min, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min. Esse extrato diluído no tampão de trabalho na proporção de 50:50 v/v foi denominado solução estoque de CAPS. Utilizaram-se as concentrações iniciais: $C_{PAR} = 1,02 \times 10^{-4}$ mol/L e $C_M = 5,01 \times 10^{-5}$ mol/L. Foram utilizados 0,99, 1,98 e 2,97 mL de solução estoque de CAPS para as misturas em balões volumétricos de 10 mL, utilizando-se uma mistura de cachaça:tampão 50:50 v/v para ajuste da proporção de solvente.

Registraram-se espectros eletrônicos das soluções de PAR, CAPS, $MPAR_2$ e das misturas PAR+CAPS, M+CAPS e $MPAR_2$ +CAPS.

Para destacar o efeito da adição de CAPS nas soluções de complexos $MPAR_2$, diluiu-se o extrato em tampão na proporção extrato:tampão 80:20 v/v, denominada solução estoque de CAPS(2), utilizando $C_{PAR} = 2,50 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_M = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L. Foram utilizados 0,05, 0,99, 2,48, 4,98 e 7,46 mL de solução estoque de CAPS(2) para as misturas em balões volumétricos de 25 mL, utilizando-se uma mistura de cachaça:tampão 80:20 v/v para ajuste da proporção de solvente..

3.3.6.2. Estudo da Influência de CAPS no Complexo $MPAR_2$ em Cachaça

Buscando simplificar o método espectrofotométrico em desenvolvimento, testou-se substituir os tampões por cachaça como solvente majoritário no preparo das misturas $CoPAR_2$ +CAPS, que apresentaram espectros com absorção em 510 nm inversamente proporcional a C_{CAPS} no item 3.3.6.1, avaliado como o melhor resultado obtido.

Utilizou-se extrato de CAPS de pimenta de-cheiro-do-Pará com $C_{CAPS} = 0,99 \pm 0,03$ mg CAPS/g pimenta (quantificado por HPLC). Foram preparadas misturas PAR+CAPS, Co+CAPS e $CoPAR_2$ +CAPS a partir das seguintes concentrações iniciais: $C_{CAPS} = 0,0001$ a 0,36 mg CAPS/g pimenta, $C_{PAR} = 2,510^{-5}$ mol/L e $C_{Co^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L.

Na sequência, foram preparadas outras misturas buscando-se maiores absorbâncias, variando as concentrações finais de $CoPAR_2$ de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações finais de CoPAR₂ estudadas.

Solução	C _{PAR} mol/L	C _{Co²⁺} mol/L
1	$2,58 \times 10^{-6}$	$1,28 \times 10^{-6}$
2	$1,27 \times 10^{-5}$	$6,28 \times 10^{-6}$
3	$2,56 \times 10^{-5}$	$1,28 \times 10^{-5}$
4	$6,23 \times 10^{-5}$	$3,10 \times 10^{-5}$
5	$1,27 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-5}$
6	$2,54 \times 10^{-4}$	$1,26 \times 10^{-4}$

3.3.6.3. Construção da Curva Analítica

Utilizou-se extrato de pimenta dedo-de-moça quantificado por HPLC obtendo-se $0,80 \pm 0,03$ mg CAPS/g pimenta. As seguintes concentrações iniciais $C_{CAPS} = 0,0003$ a $0,6$ mg CAPS/g pimenta, $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L foram utilizadas para estudar misturas CoPAR₂+CAPS.

3.3.6.4. Comparação de Resultados de Quantificação

A partir das concentrações estabelecidas para a reação colorimétrica, C_{CAPS} entre $0,001$ e $0,03$ mg CAPS/g pimenta, $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L foram preparadas as misturas CoPAR₂+CAPS para construção da curva analítica e quantificação de CAPS em 9 amostras de pimentas *Capsicum* pelo método espectrofotométrico proposto (VIS). E, essas amostras também foram quantificadas pelo método HPLC descrito no item 3.3.2.

Visando reduzir eventual efeito de interferentes no método VIS, optou-se por trabalhar com padrão interno, utilizando-se extrato de pimenta dedo-de-moça em cachaça como “extrato padrão” com $0,477 \pm 0,004$ mg CAPS/g pimenta (quantificação HPLC). Esse extrato foi diluído para $0,048 \pm 0,005$ mg CAPS/g pimenta e 1 mL do mesmo foi adicionado em balão de 25 mL, onde eram adicionados 3 mL do extrato da pimenta a ser quantificada, obtido nas mesmas condições do “extrato padrão” e também diluído 10 vezes.

As misturas foram preparadas em triplicata e o registro do espectro eletrônico foi registrado em duplicata.

3.3.6.5. Estequiometria da espécie CoPAR₂CAPS_n

A mistura CoPAR₂+CAPS, utilizando cachaça como solvente majoritário, apresentou absorção em 510 nm proporcional a C_{CAPS} , o que permitiu a construção da curva analítica

para a quantificação de CAPS totais pelo método espectrofotométrico, conforme descrito no item 3.3.6.3.

Para estabelecer a proporção estequiométrica da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_n$ com máxima absorção em 510 nm, aplicou-se o método das variações contínuas (SIROKI *et al*, 1975). Para verificar a proporção CoPAR_2 em cachaça, fixou-se a soma de C_{PAR} e $C_{\text{Co}^{2+}}$ em três valores $C_{\text{PAR}} + C_{\text{Co}^{2+}} = 3,84 \times 10^{-5}$, $1,91 \times 10^{-5}$ e $9,35 \times 10^{-5}$ mol/L. Para avaliar a estequiometria da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_n$ em cachaça, fixou-se a soma C_{CAPS} e C_{CoPAR_2} em três valores: $C_{\text{CAPS}} + C_{\text{CoPAR}_2} = 1,03 \times 10^{-4}$, $1,34 \times 10^{-4}$ e $1,93 \times 10^{-4}$ mol/L.

Foi utilizado extrato de CAPS de pimenta dedo-de-moça com $C_{\text{CAPS}} = 0,57 \pm 0,04$ mg CAPS/g pimenta, ou seja, $1,15 \times 10^{-3}$ mol/L, assumindo massa molar média de CAPS = 299 g/mol, estimada através da média das massas molares dos principais CAPS encontrados, relacionados na Tabela 6.

3.3.6.6. Estudo da existência da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$

Tendo estabelecido a proporção estequiométrica da espécie como sendo $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ foi realizado estudo para comprovar a existência dessa espécie como espécie cromófora com máximo de absorção em 510 nm.

Foi utilizado extrato de CAPS de pimenta dedo-de-moça com $C_{\text{CAPS}} = 0,50 \pm 0,03$ mg CAPS/g pimenta, ou seja, $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, assumindo massa molar média de CAPS 299 g/mol.

Em balão volumétrico de 25 mL foram preparadas duas misturas $\text{CoPAR}_2 + \text{CAPS}$ e uma solução CoPAR_2 , com as seguintes concentrações finais $C_{\text{PAR}} = 6,21 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{\text{Co}^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{\text{CAPS}} = 1 \times 10^{-5}$ e 2×10^{-5} mol/L.

Foi realizada extração líquido-líquido com 5 mL de cada mistura e 25 mL de álcool isoamílico em funil de separação de 100 mL. Registraram-se espectros eletrônicos entre 190 e 800 nm das misturas em cachaça e o extrato em álcool isoamílico, utilizando os respectivos solventes como branco.

Capítulo 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Registros das exsicatas das pimenteiras

Todos os registros das espécies relacionadas na Tabela 5 estão apresentadas no Anexo 1, que traz as etiquetas de registro das exsicatas das pimenteiras no Herbário UEC, com o formato típico da Figura 15.

Tabela 5. Números dos registros de exsicatas obtidos para as pimenteiras *Capsicum* (C.).

Pimenta			Exsicata
Nome popular da pimenta	Nome Científico	Procedência	Registro
Americana	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149514
Balão	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	150803
Bhut jolokia	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149522
Biquinho	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	149516
Bode	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	151666
Brinco-de-princesa	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	151665
Caiena*	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149515
Cambuci	<i>C. baccatum</i>	Fazenda Ituaú	149512
Cascabel	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149513
Culiacan	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149511
Cumari	<i>C. baccatum</i>	Joaquim Egídio	151667
Pimenta-de-cheiro	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	151663
Pimenta-de-cheiro-do-Pará	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149523
Dedo-de-moça	<i>C. baccatum</i>	Joaquim Egídio	151668
Guajillo	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149518
Habanero laranja	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149527
Habanero mustard	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149517
Jalapeño	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	151664
Malagueta*	<i>C. frutescens</i>	Joaquim Egídio	151670
Murupi da Amazônia gold	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149520
Murupi golden	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149521
Murupi laranja	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149524
Murupi verde	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	61577
Murupi vermelha	<i>C. chinense</i>	Fazenda Ituaú	149519
Peter pepper*	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149526
Pitanga	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	151669
Poblano	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	53836
Rocoto*	<i>C. pubescens</i>	Fazenda Ituaú	149525
Saco	<i>C. chinense</i>	Joaquim Egídio	58093
Serrano	<i>C. annuum</i>	Fazenda Ituaú	149510

Onde: * indica as pimentas que não puderam ser estudadas experimentalmente.

PLANTAS DO BRASIL Herbário UEC	
 UNICAMP	Solanaceae
<i>Capsicum frutescens</i>	
Carvalho, S. I.C. 2 2010	151670
Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w.	
Popularmente conhecida como: malagueta; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 3 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro.	
Souza, P. T. 9 4/ 2/ 2010	
Dupl.: UEC	

Figura 15. Exemplo da etiqueta de registro de exsicata das pimenteiras no Herbário UEC.

4.2. Adaptação do Método Oficial para Quantificação de CAPS

Os cromatogramas dos extratos de CAPS e padrão de DHCAP estão ilustrados na Figura 16.

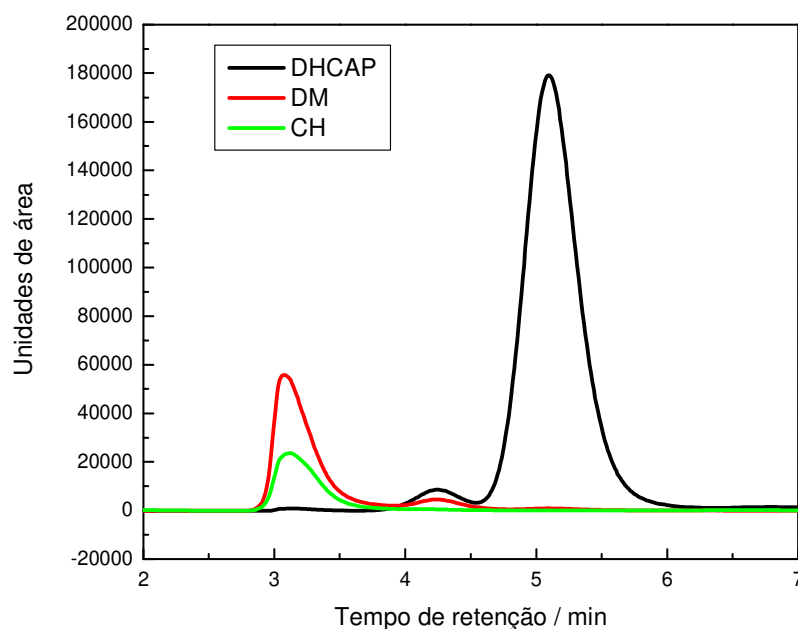


Figura 16. Cromatogramas do padrão de DHCAP 0,5 mg/mL, extrato de pimenta dedo-de-moça – DM e extrato de pimenta de-cheiro-do-Pará – CH.

Nesses cromatogramas não foram obtidos os picos em tempos de retenção relativos próximos a 0,9 para NDHCAP, 1,0 para CAP e 1,6 para DHCAP, indicando que nestas condições, não houve a separação esperada para o cálculo proposto pelo método oficial. Para esclarecer esse comportamento, realizou-se um estudo por UHPLC-MS para checar a composição das amostras e do padrão de DHCAP para estabelecer uma relação para quantificação de CAPS totais nas amostras pelo método HPLC adaptado. As razões massa/carga (m/z) dos CAPS monitoradas no experimento e relevantes para a interpretação dos espectros de massas das Figuras 17 a 19 estão relacionadas na Tabela 6.

Tabela 6. Dados para a interpretação dos espectros de massas das Figuras 17 a 19 (PRUTHI, 2003).

Nome	Sigla	Massa molar g/mol	Razão m/z
Capsaicina	CAP	305	306
Dihidrocapsaicina	DHCAP	307	308
Norcapsaicina	NCAP	291	292
Nornorcapsaicina	NNCAP	277	278
Nordihidrocapsaicina	NDHCAP	293	294
Nornordihidrocapsaicina	NNDHCAP	279	280
Homocapsaicina	HCAP	319	320
Homodihidrocapsaicina	HDHCAP	321	322

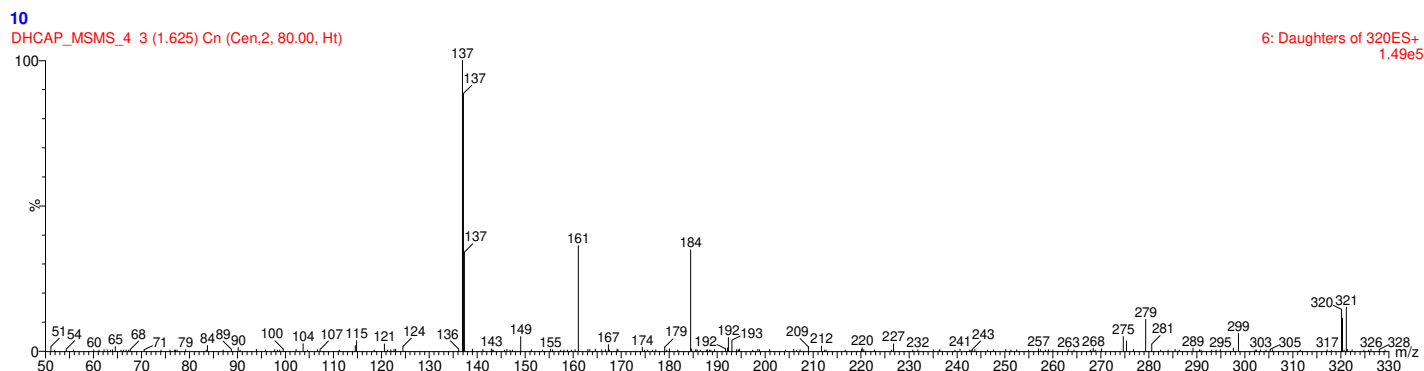
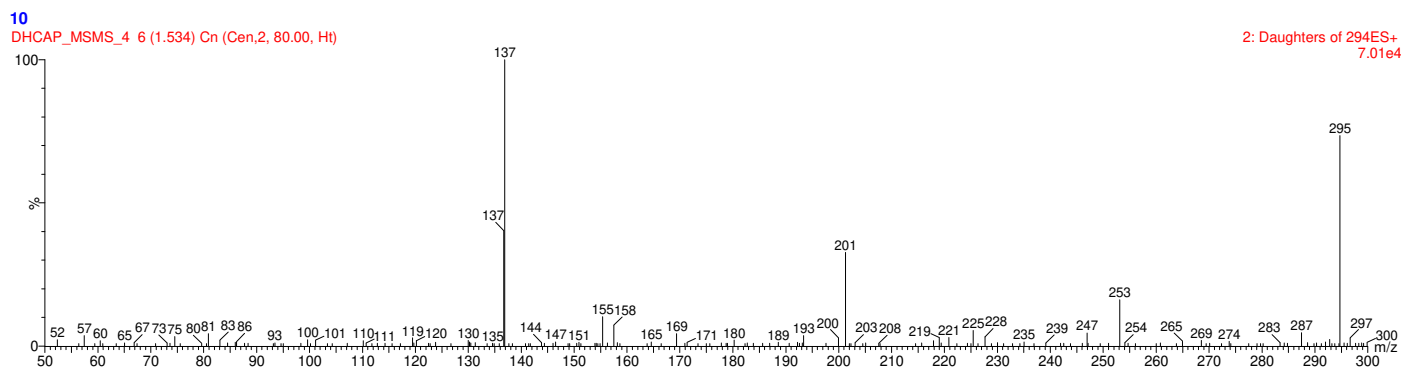
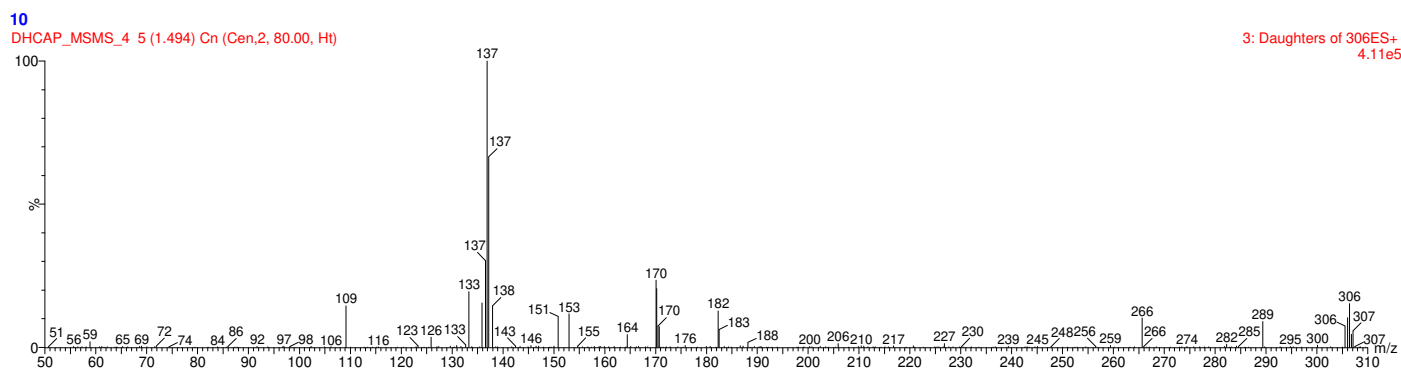
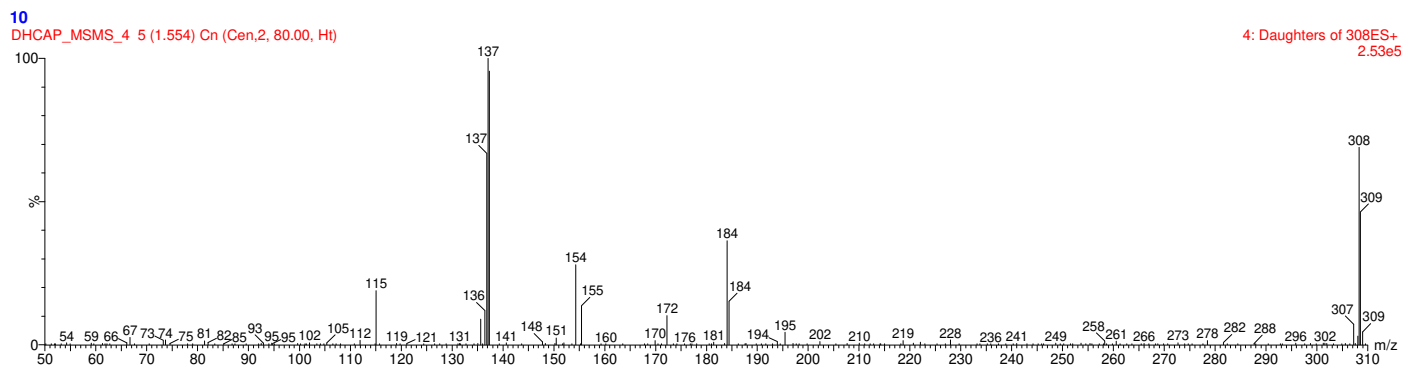
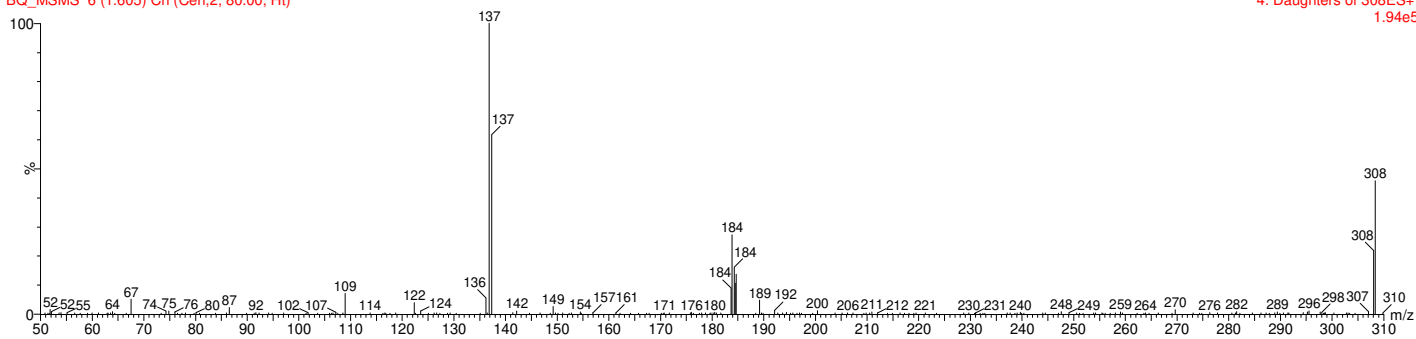
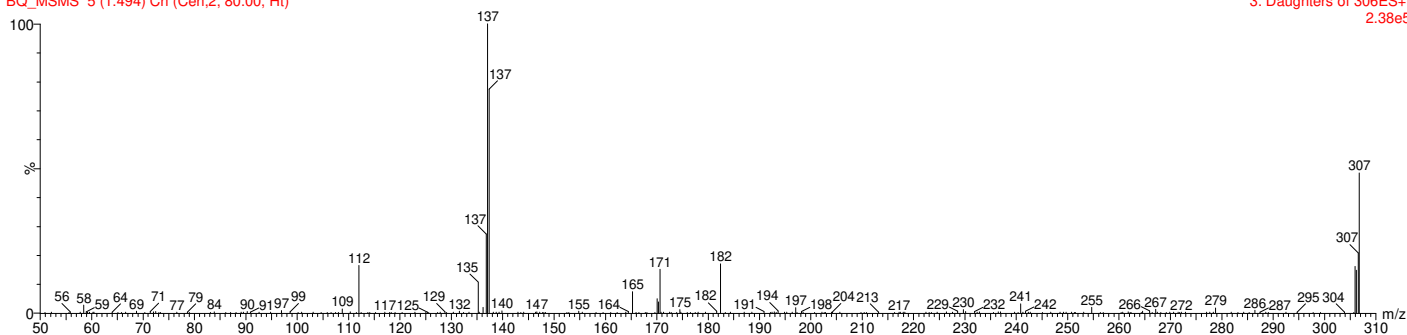


Figura 17. Espectros de massas da solução de padrão DHCAP preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram DHCAP (308 m/z), CAP(306 m/z), NDHCAP (294 m/z) e HCAP (320 m/z).

BQ_MSMS 6 (1.605) Cn (Cen.2, 80.00, Ht)



BQ_MSMS 5 (1.494) Cn (Cen.2, 80.00, Ht)



BQ_MSMS 5 (1.696) Cn (Cen.2, 80.00, Ht)

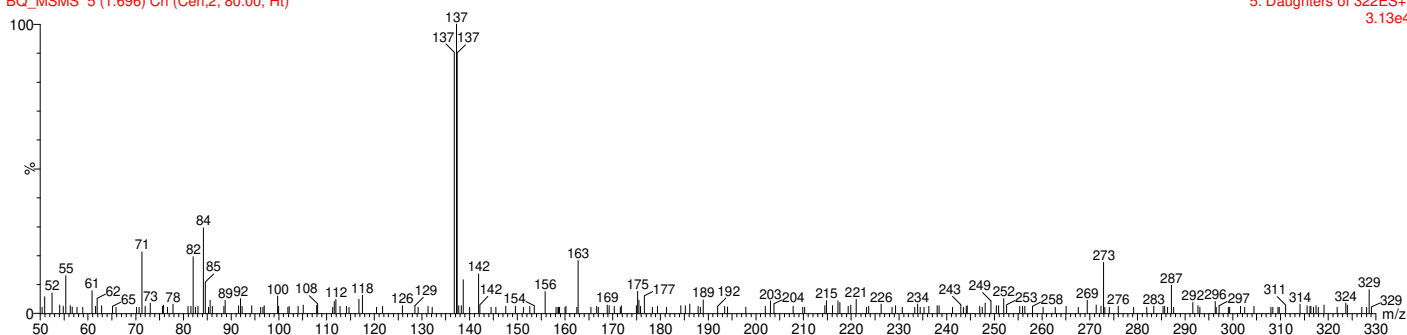
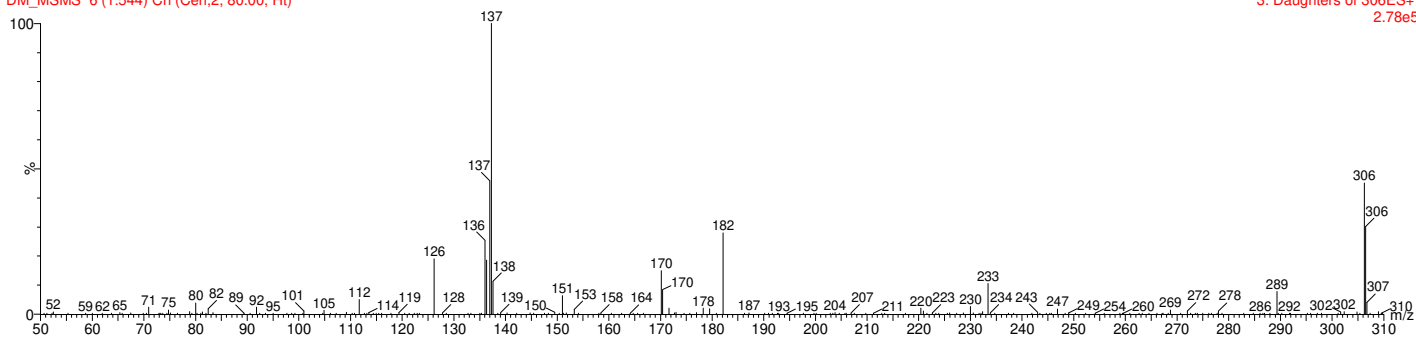
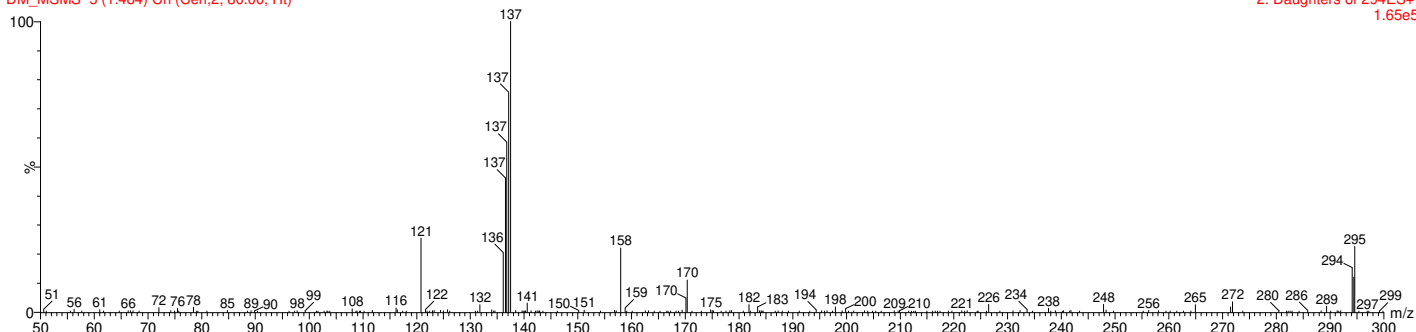


Figura 18. Espectros de massas da solução de extrato de pimenta de-cheiro-do-Pará preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram DHCAP (308 m/z), CAP (306 m/z) e HDHCAP (322 m/z).

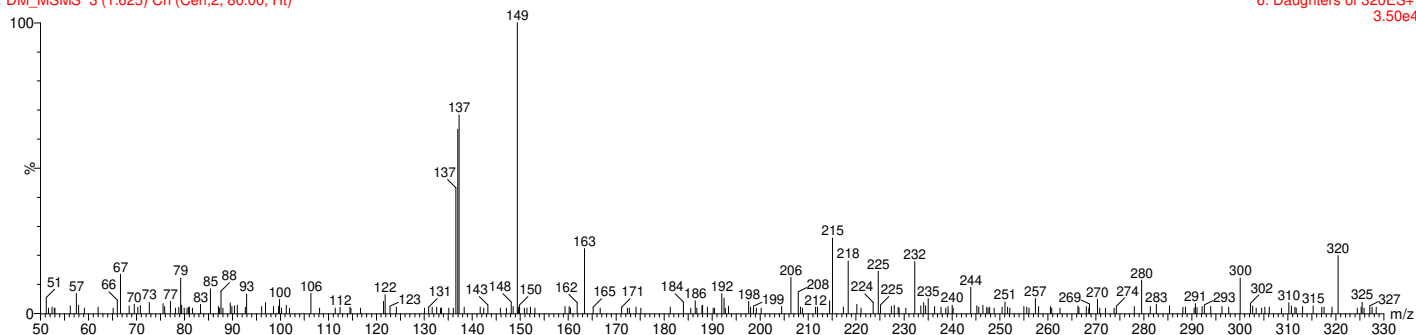
DM_MSMS 6 (1.544) Cn (Cen,2, 80.00, Ht)



DM_MSMS 5 (1.484) Cn (Cen,2, 80.00, Ht)



DM_MSMS 3 (1.625) Cn (Cen,2, 80.00, Ht)



DM_MSMS 5 (1.696) Cn (Cen,2, 80.00, Ht)

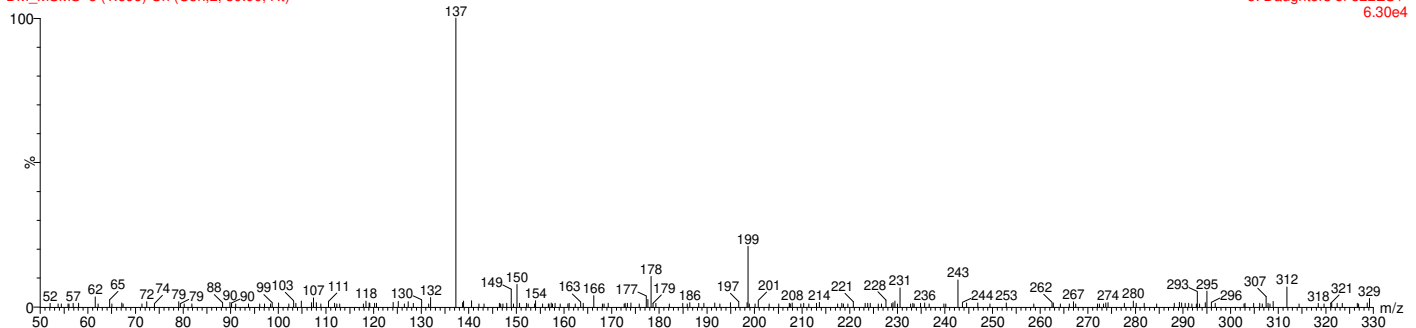


Figura 19. Espectros de massas da solução de extrato de pimenta dedo-de-moça preparada conforme descrito no item 3.3.2. Os CAPS identificados foram CAP (306 m/z), NDHCAP (294 m/z), HCAP (320 m/z) e HDHCAP (322 m/z).

Os dados dos espectros de massas obtidos por UHPLC-MS, sistematizados na Tabela 6, indicaram que nem sempre CAP, DHCAP e NDHCAP estão presentes nas pimentas, além disso, outros CAPS, não previstos pelo método, podem ser encontrados. Neste contexto, considerando as adaptações realizadas para uso de DHCAP como padrão e a massa da alíquota do extrato de 1000 mg usada no preparo da amostra, optou-se por calcular C_{CAPS} totais pelo método HPLC em mg CAPS/g pimenta, de acordo com a Equação 2.

$$C_{CAPS} = \frac{(C_{PD} \times P \times S_{AM})}{S_{PD}} \times V_B \times \frac{m_{EXT}}{m_{ALÍQ}} \times \frac{1}{m_{PIM}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: C_{PD} = concentração do padrão de DHCAP em mg/mL; P = pureza percentual de DHCAP; S_{AM} = soma das áreas dos picos da amostra (todos os picos entre 2 e 7 min); S_{PD} = soma das áreas do padrão; V_B = volume do balão de preparo da amostra; m_{EXT} = massa em gramas do extrato obtido; $m_{ALÍQ}$ = massa em gramas da alíquota de extrato utilizada no preparo da amostra e m_{PIM} = massa em gramas de pimenta utilizada na obtenção do extrato.

Os espectros eletrônicos registrados para a solução padrão DHCAP e para os extratos estão ilustrados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

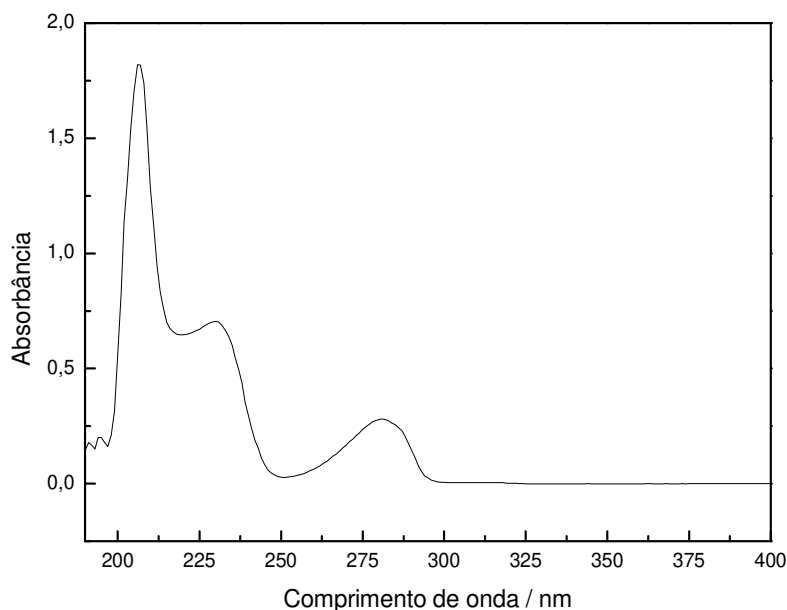


Figura 20. Espectro eletrônico do padrão de DHCAP 1×10^{-4} mol/L em etanol absoluto, solvente usado também como branco.

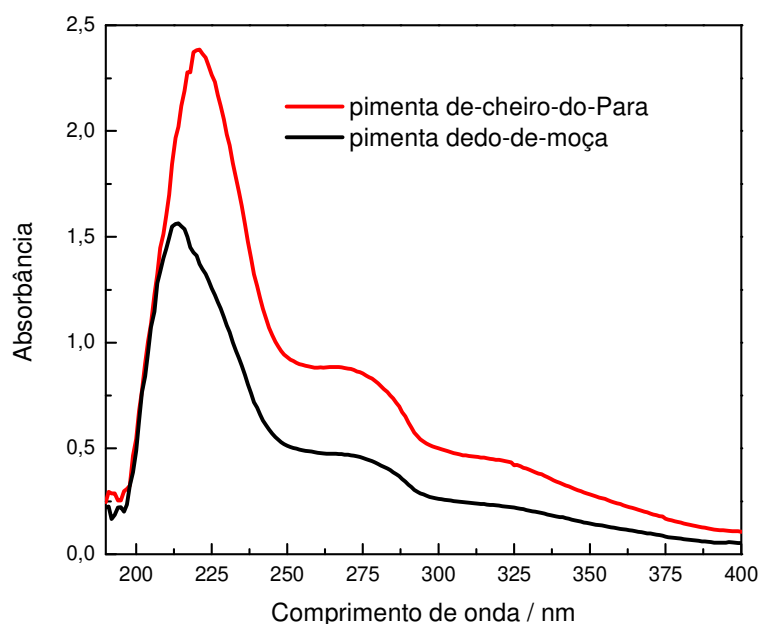


Figura 21. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta de-cheiro-do-Pará e pimenta biquinho diluídos 10 vezes em cachaça, solvente usado também como branco.

O perfil espectral da solução padrão de DHCAP (Figura 20) é reconhecido nos espectros eletrônicos de extratos diluídos, Figura 21, o que indica a eficiência do método de extração de CAPS estudado e aponta a adequação das condições cromatográficas aplicadas.

Duas amostras do padrão de DHCAP contendo aproximadamente 0,5 mg/mL, foram quantificadas pelo método HPLC. Os resultados de concentração obtida a partir dos valores de massa e volume utilizados no preparo da solução (C_{CAPS} m/v) e da aplicação dos dados cromatográficos na Equação 2 (C_{CAPS} HPLC) estão apresentados na Tabela 7. A diferença relativa entre o valor de concentração estimado (C_{CAPS} m/v) e o valor encontrado experimentalmente (C_{CAPS} HPLC) e o valor de t , calculado com 95% de confiança e 2 graus de liberdade (3 replicatas) com $t_{crítico} = 4,30$ (SKOOG *et al.*, 2011), indicam a exatidão do método HPLC adaptado. Todo tratamento matemático destes testes está detalhadamente descrito no Anexo 2.

Tabela 7. Resultados das amostras de DHCAP quantificadas por HPLC.

Amostra de DHCAP	C_{CAPS} m/v (mg/mL)	C_{CAPS} HPLC (mg/mL)	Diferença relativa (%)	t
1	0,44±0,01	0,43±0,02	2,3	0,02
2	0,43±0,01	0,42±0,02	2,4	0,02

4.3. Obtenção e Armazenamento de Extratos de CAPS

4.3.1. Obtenção e Armazenamento de Extratos Etanólicos

Este estudo foi realizado com pimentas bode, balão, sacco, cumari e pitanga.

Foram avaliadas variações no perfil espectral e intensidade de absorbância entre 200-300 nm, onde há absorção característica de CAPS, entre 440-480 nm onde absorvem os carotenóides e 330-430 nm onde se observou alteração do perfil espectral e efeito de hipercromismo.

Os espectros eletrônicos dos extratos de pimenta bode armazenados em 6 °C estão ilustrados na Figura 22.

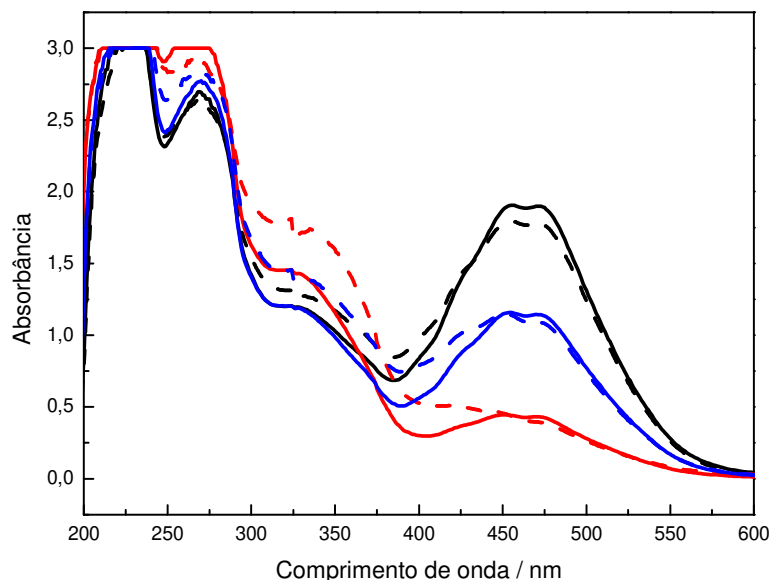


Figura 22. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta bode armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol absoluto**, **etanol 90%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

A variação da absorbância nos máximos de absorção em 330, 420, 450 e 470 nm observada durante o armazenamento dos extratos de pimenta bode em diferentes proporções de etanol em 6 °C está ilustrada nas Figuras 23 a 25. A região entre 200 e 300 nm, onde há absorção de CAPS, não foi explorada devido aos elevados valores de absorbância na faixa de concentração estudada.

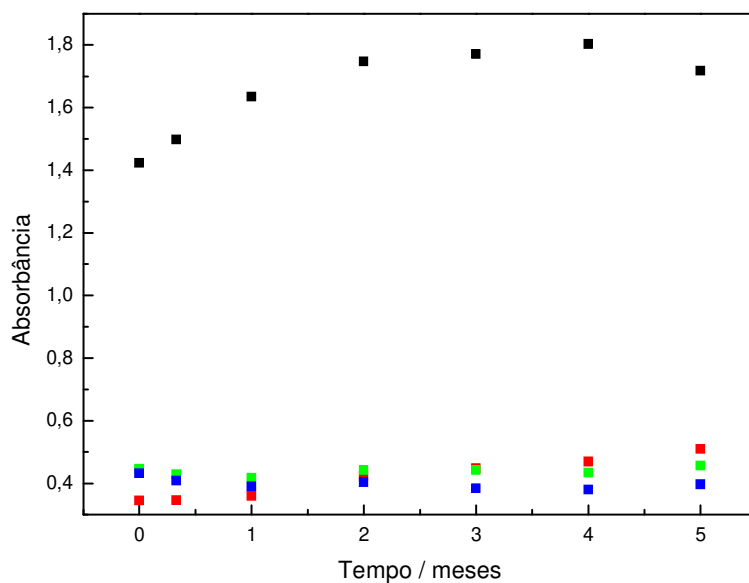


Figura 23. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol 70%, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

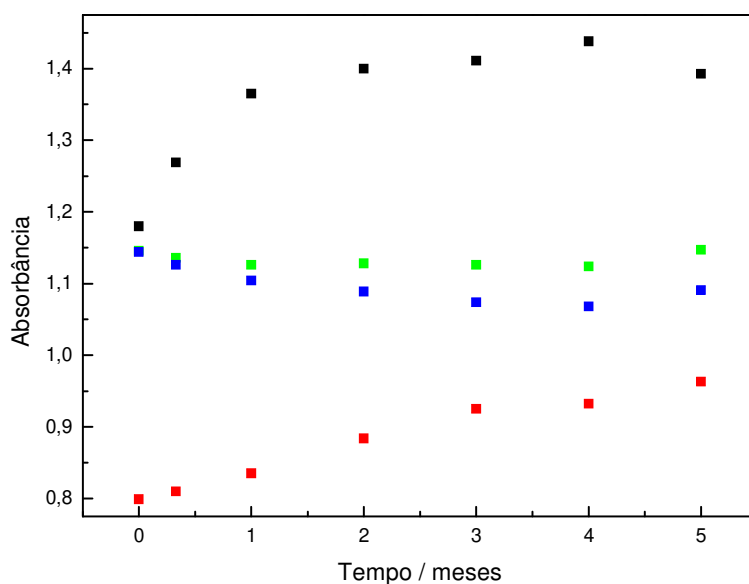


Figura 24. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol 90%, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

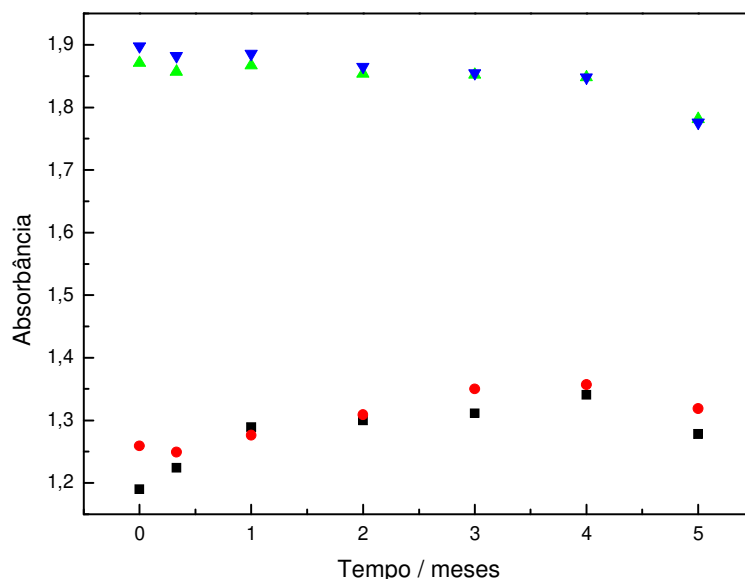


Figura 25. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados em 6 °C, em etanol absoluto, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

Os dados da Figura 22 apontaram que o aumento na proporção de etanol no solvente extrator aumentava a quantidade de carotenóides extraídos, indicada pelo aumento de absorbância entre 440 e 480 nm e menor a quantidade de capsaicinóides, indicada pela redução da absorbância entre 200 e 300 nm. As Figuras 23 a 25 destacam o efeito de hipercromismo em 330 nm e a diminuição das absorbâncias em 450 e 470 nm (característicos de carotenóides), que pode estar associado à alteração do perfil espectral em 420 nm, o que indica à formação de produto de decomposição do extrato. Comportamento análogo foi observado com extratos de pimenta balão (Figura 26) e pimenta saco (Figura 27) sob as mesmas condições.

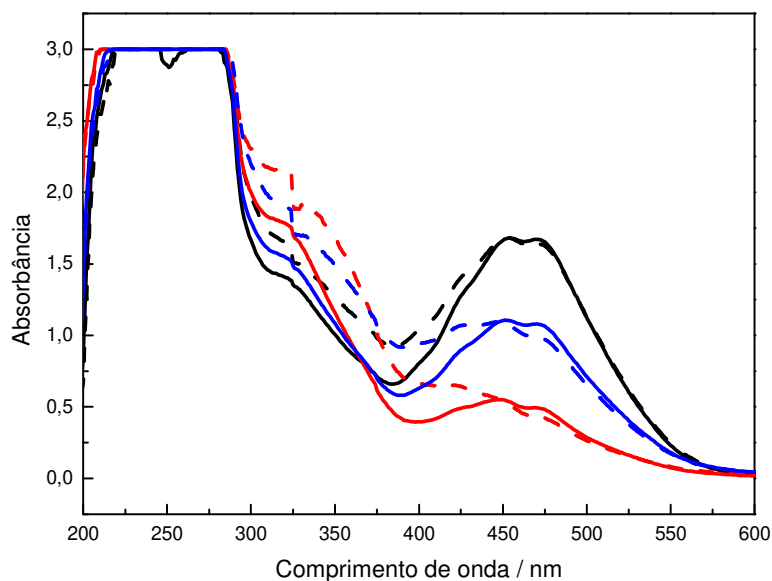


Figura 26. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta balão armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol absoluto**, **etanol 90%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

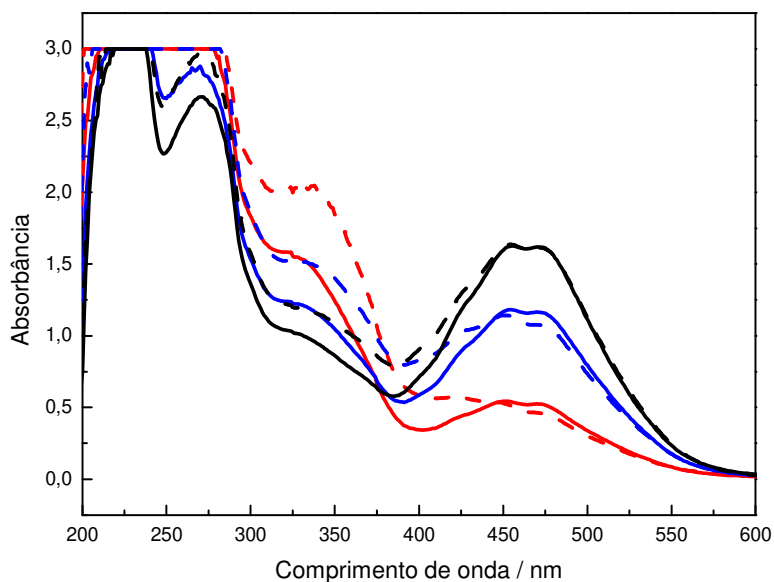


Figura 27. Espectros eletrônicos de extratos de pimenta saco armazenados em 6 °C por 5 meses. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol absoluto**, **etanol 90%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e as linhas tracejadas são os dados de extratos com 5 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

Tendência de comportamento análogo foi observada para extratos etanólicos de pimenta bode armazenados à temperatura ambiente, como indicam os espectros eletrônicos da Figura 28.

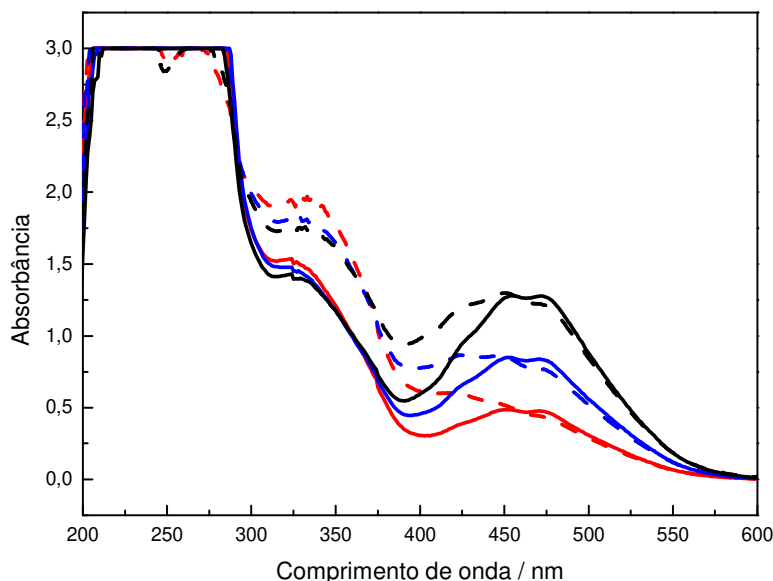


Figura 28. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta bode armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol 90%**, **etanol 80%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

A variação da absorbância nos máximos de absorção 330, 420, 450 e 470 nm observada durante o armazenamento dos extratos de pimenta bode em diferentes proporções de etanol a temperatura ambiente está ilustrada nas Figuras 29 a 31.

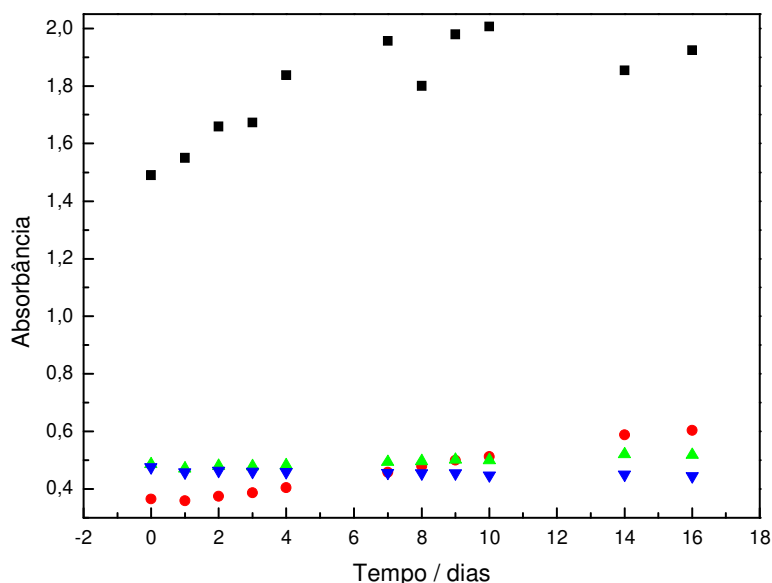


Figura 29. Variação de absorvância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 70%, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

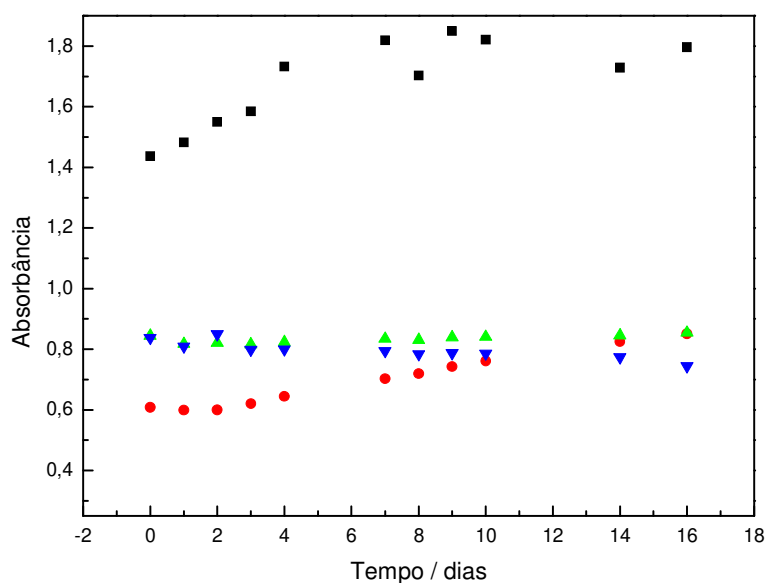


Figura 30. Variação de absorvância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 80%, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

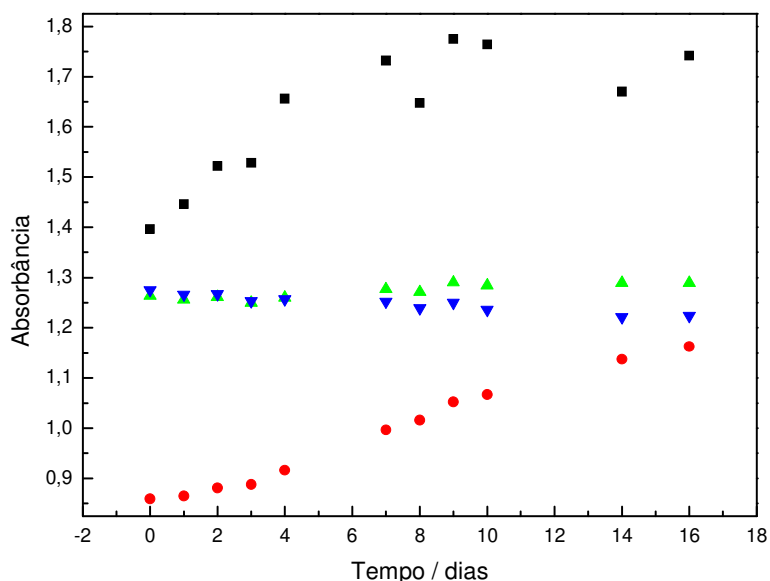


Figura 31. Variação de absorbância em função do tempo para extratos de pimenta bode, armazenados à temperatura ambiente, em etanol 90%, sendo as cores referentes a 330, 420, 450 e 470 nm. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

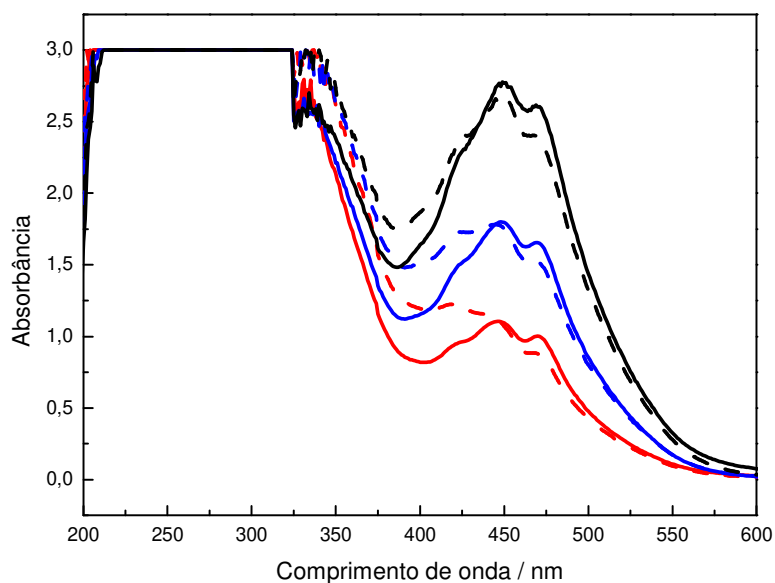


Figura 32. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta cumari armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol 90%**, **etanol 80%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

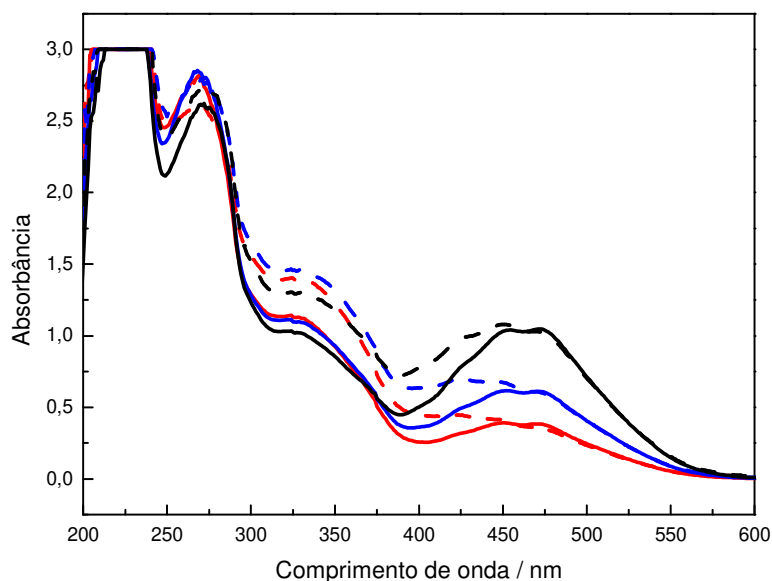


Figura 33. Espectros eletrônicos dos extratos de pimenta pitanga armazenados a temperatura ambiente por 16 dias. As cores são referentes ao extrato obtido utilizando **etanol 90%**, **etanol 80%** e **etanol 70%** em água. Linhas cheias representam os extratos frescos e linhas tracejadas representam extratos armazenados por 16 dias. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

Comportamento análogo ao dos espectros de pimenta bode (Figuras 28 a 31) foi observado com extratos de pimenta cumari (Figura 32) e pimenta pitanga (Figura 33) sob as mesmas condições.

A seguir são apresentados os espectros eletrônicos dos extratos obtidos utilizando-se cachaça de teor alcoólico 39% e/ou etanol de uso doméstico 46 °INPM como solvente extrator de pimenta balão para comparar sua estabilidade com relação aos extratos obtidos utilizando etanol absoluto ou diluído em água.

Os espectros eletrônicos dos extratos em cachaça, armazenados em 6 °C por 4 meses, estão ilustrados na Figura 34. Nas Figuras 35 e 36 estão ilustrados os espectros eletrônicos dos extratos em cachaça diluídos 5 e 10 vezes e armazenados em 6 °C por 4 meses. Na Figura 37 estão ilustrados os espectros eletrônicos dos extratos em etanol de uso doméstico 46 °INPM, armazenados em 6 °C por 4 meses.

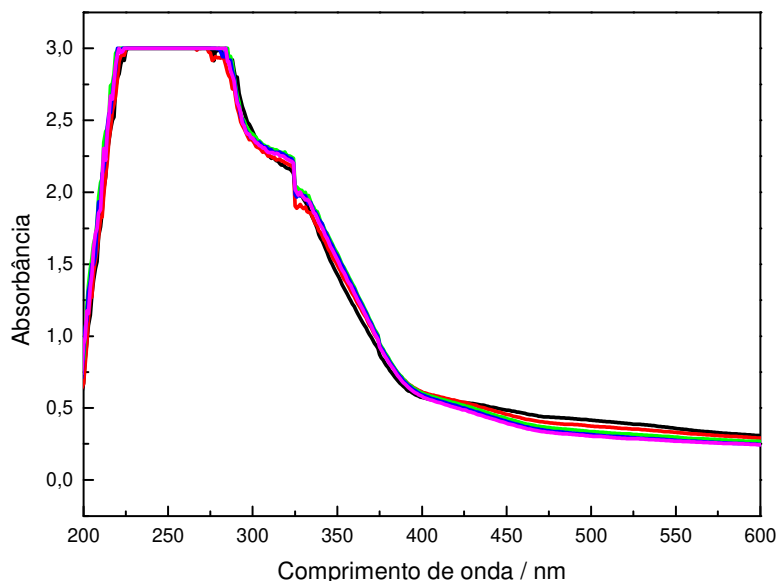


Figura 34. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39% e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: **extratos frescos**, 1, 2, 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

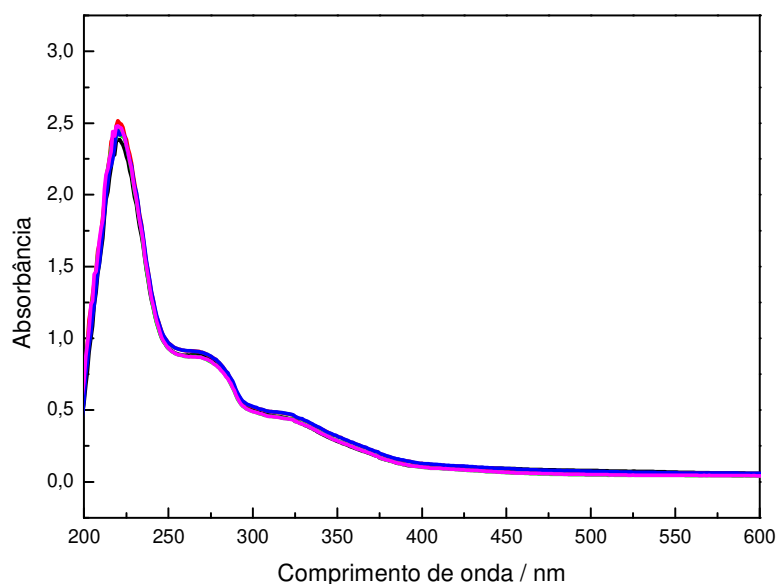


Figura 35. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39%, diluídos 5 vezes e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: **extratos frescos**, 1, 2, 3 e 4 meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

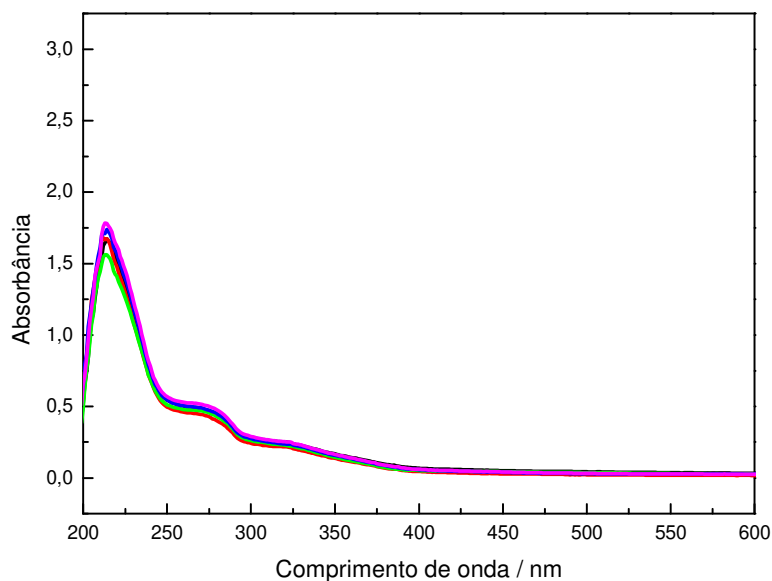


Figura 36. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando cachaça de teor alcoólico 39%, diluídos 10 vezes e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: **extratos frescos**, **1**, **2**, **3** e **4** meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

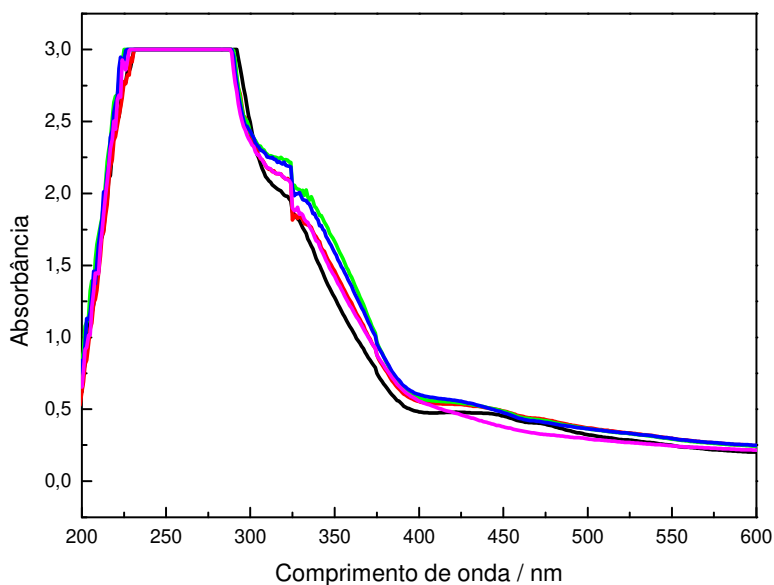


Figura 37. Espectros eletrônicos registrados para os extratos de pimenta balão utilizando etanol de uso doméstico 46 °INPM e armazenados por 4 meses. As cores são referentes à idade dos extratos: **extratos frescos**, **1**, **2**, **3** e **4** meses de armazenamento. O branco utilizado foi o respectivo solvente de cada solução.

Pode-se observar uma alteração do perfil espectral comparando-se os espectros eletrônicos dos extratos obtidos em etanol (absoluto ou diluído com água) em relação aos espectros eletrônicos dos extratos obtidos em cachaça ou etanol de uso doméstico. Quando o solvente extrator é cachaça ou etanol de uso doméstico (Figura 34 e Figura 37) a quantidade de carotenóides extraídos diminui, o que pode ser notado pela diminuição da absorbância entre 440 e 480 nm, enquanto que a quantidade de CAPS aumenta, como indica o aumento da absorbância entre 200 e 300 nm.

Para os extratos em etanol absoluto ou diluído notou-se hipercromismo e alteração do perfil espectral na região entre 330 e 430 nm, o que foi associado à formação de produto de decomposição, mas os dados dos espectros dos extratos em cachaça e/ou etanol de uso doméstico apresentados nas Figura 34 e Figura 37 não indicaram o mesmo comportamento. Isso indica maior estabilidade dos extratos em cachaça e/ou etanol de uso doméstico. Nos extratos em cachaça diluídos (Figura 35 e Figura 36) os máximos de absorção característicos de CAPS entre 200 e 300 nm podem ser observados com maior definição e apontam a eficiência da extração utilizando tal solvente.

A variação de absorbância entre 330 e 430 nm está sendo associada a um produto de decomposição. Como nos espectros de extratos obtidos em etanol de uso doméstico (Figura 37), houve maior variação nessa região em comparação com os extratos obtidos em cachaça (Figura 34), supõe-se que a cachaça favorece a estabilidade dos extratos obtidos.

O perfil espectral na região entre 440 e 480 nm indica menor quantidade de carotenóides para extratos em etanol de uso doméstico ou cachaça. Isso pode sugerir alguma relação destes compostos com a formação do produto de decomposição detectado entre 330 e 430 nm, que prejudica a estabilidade dos extratos etanólicos.

A estabilidade dos extratos obtidos em cachaça ou etanol de uso doméstico pode estar também associada ao baixo teor alcóolico destes solventes, já que são relatadas propriedades conservantes do etanol entre 25 e 40% (EDITORA INSUMOS, 2012). A composição química da cachaça inclui, além de água e etanol, outros componentes minoritários como: metanol, álcool isoamílico, isobutanol, propanol, acetaldeído, acetato de etila, caprilato de etila, ácido acético e dimetilssulfato (BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2006; PINHEIRO, LEAL e ARAÚJO 2003). A cachaça utilizada nesse trabalho, Pirassununga - 51[®] de teor alcoólico 39%, passa por processos de uniformização do teor alcoólico e da acidez,

portanto, para garantir a simplicidade do método proposto optou-se por seu uso. Além disso, o uso de cachaça no processo de extração aproxima o sistema analítico às condições de amostras típicas de consumo no Brasil, onde é comum conservar pimentas em cachaça.

4.3.2. Aperfeiçoamento da Extração de CAPS em Cachaça

O aperfeiçoamento da extração de CAPS visou melhorar o processo de obtenção rápida e uniforme de CAPS com C_{CAPS} adequada para aplicação dos métodos de quantificação estudados. Deve ser destacado que não se pretendeu extração exaustiva de CAPS. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 8.

Tabela 8. Dados obtidos para o aperfeiçoamento do método de extração.

Massa de pimenta / g	Tempo de agitação / min	mg CAPS / g pimenta
10	30	0,48±0,01
	60	0,48±0,01
	90	0,54±0,01
20	30	0,83±0,01
	60	0,92±0,02
	90	0,99±0,03
30	30	1,15±0,02
	60	1,30±0,07
	90	1,38±0,05

*O volume utilizado de cachaça foi de 50 mL.

Nota-se que C_{CAPS} é proporcional ao tempo de extração e à massa de pimenta utilizada, como seria esperado. Considerando-se os resultados obtidos com maior efeito da massa na concentração extraída, optou-se por fixar a proporção massa de pimenta:volume de cachaça em 30:50 g/mL, sob agitação durante 30 min, seguindo-se filtração simples e secagem natural por 10 min, para garantir a agilidade do método de extração.

4.4. Monitoramento das Pimentas Armazenadas sob -11 °C

Nesta etapa, foi avaliada a variação de C_{CAPS} durante o período de armazenamento de pimentas sob -11 °C para verificar a adequação do congelamento dos frutos como forma de estocagem de matéria-prima.

Os espectros eletrônicos registrados dos extratos em cachaça de pimenta dedo-de-moça estão ilustrados na Figura 38 e a Tabela 9 relaciona as C_{CAPS} determinadas pelo método HPLC durante o período de armazenamento.

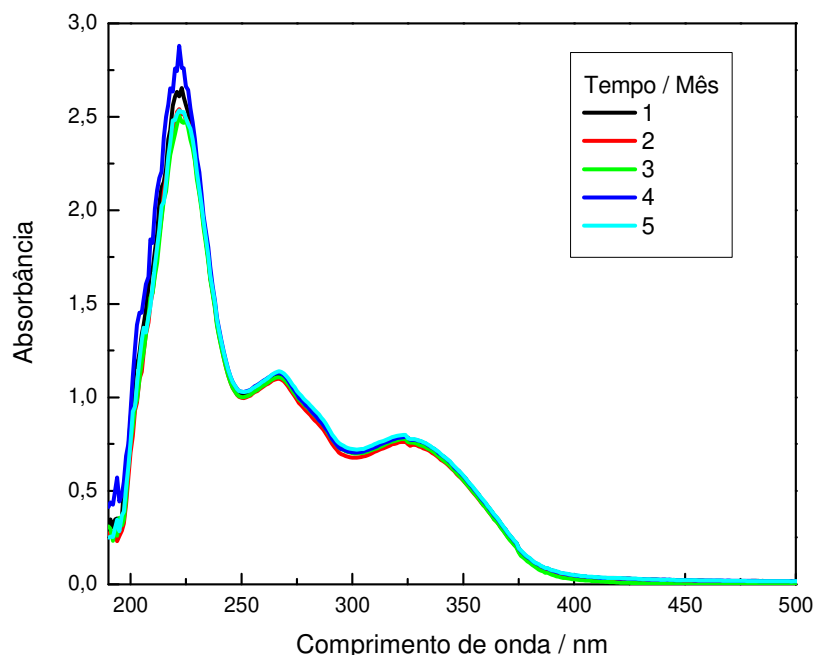


Figura 38. Espectros de extratos de pimenta dedo-de-moça na proporção pimenta:cachea 30:50 g/mL diluídos 5 vezes, utilizando cachea como branco.

Tabela 9. C_{CAPS} em pimenta dedo-de-moça armazenada em $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Período de armazenamento (mês)	C_{CAPS} (mg CAPS/g pimenta)	Q	t
1	$1,51 \pm 0,04$	-	-
2	$1,48 \pm 0,04$	0,030	-2,12
3	$1,47 \pm 0,06$	0,125	-1,89
4	$1,46 \pm 0,02$	0,125	-7,07
5	$1,43 \pm 0,05$	0,375	-4,53

Embora não tenha sido notada alteração no espectro eletrônico dos extratos, a C_{CAPS} diminuiu ao longo do período de armazenamento a $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ das pimentas dedo-de-moça utilizadas para obtenção dos extratos. Pode-se considerar que a estrutura celular mais rígida das pimentas pode ser danificada por cristais de gelo formados no processo de congelamento dos frutos, sendo que a extensão do dano que leva ao rompimento da estrutura depende do tamanho dos cristais e, portanto, da taxa de transferência de calor. Quanto menor a taxa de transferência de calor maior o tamanho dos cristais de gelo formados (FELLOWS, 2006). Com a estrutura celular danificada, CAPS são liberados para o

exterior das células e podem ser perdidos junto com o líquido formado no descongelamento dos frutos. Além disso, nesta condição os CAPS podem passar a ficar expostos à ação de agentes de degradação, que a estrutura celular isolaria.

Considerando o teste Q aplicado para um nível de confiança de 95% e um conjunto de 5 medidas tem-se $Q_{\text{crítico}} = 0,710$ (SKOOG *et al.*, 2011 e BACCAN *et al.*, 2003) sem rejeição de qualquer valor de C_{CAPS} . Aplicando-se teste t com 95% de confiança e 8 graus de liberdade (9 replicatas) com $t_{\text{crítico}} = 2,31$ (SKOOG *et al.*, 2011) não se notou diferença significativa entre os valores obtidos, indicando que não houve redução significativa da C_{CAPS} em até 3 meses de armazenamento das pimentas sob -11°C . Portanto, limitou-se o período de estocagem dos frutos nestas condições a 3 meses no máximo. Todo tratamento matemático destes testes está detalhadamente descrito no Anexo 2.

4.5. Estudo Comparativo do Estágio de Maturação das Pimentas

Este estudo teve como objetivo avaliar a variação de C_{CAPS} em diferentes estágios de maturação das pimentas. A C_{CAPS} dos extratos estudados é listada na Tabela 10.

Tabela 10. C_{CAPS} em diferentes estágios de maturação dos frutos *Capsicum*, por método HPLC.

Pimenta	mg CAPS / g pimenta			Julie Cohn*	Unidades Scoville*
	Verde	Colorida	Madura		
Guajillo	0,23±0,02	0,74±0,06	0,78±0,05	média	2.500-5.000
de-cheiro-do-Pará	0,79±0,02	0,92±0,07	1,23±0,09	média	5.000-15.000
Murupi golden	1,01±0,03	1,33±0,01	1,35±0,01	alta	50.000-100.000
Murupi laranja	1,40±0,01	1,47±0,01	1,63±0,01	alta	50.000-100.000
Murupi vermelha	1,11±0,01	1,87±0,01	2,31±0,01	alta	50.000-100.000
Murupi-da-Amazônia Gold	1,75±0,01	1,95±0,09	2,41±0,05	alta	50.000-100.000
Habanero mustard	1,15±0,03	1,86±0,01	2,51±0,07	alta	100.000-500.000
Bhut jolokia	1,72±0,01	2,12±0,01	3,34±0,09	alta	1.001.304

* Dados obtidos na literatura (VASCONCELOS, 2011)

Notou-se que a C_{CAPS} aumenta à medida que o estágio de maturação da pimenta é completado. A ordem de picância estabelecida pelos métodos organolépticos em Vasconcelos (2011) é proporcional a C_{CAPS} nas pimentas maduras determinada pelo método HPLC, porém, não é proporcional em diferentes estágios de maturação dos frutos. Portanto, optou-se por utilizar apenas pimentas maduras como fonte de CAPS na obtenção dos extratos a serem quantificados pelos métodos HPLC e VIS para comparação com os dados das escalas organolépticas disponíveis.

4.6. Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico

4.6.1. Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR₂ com Controle de pH

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico foram testadas misturas entre soluções de CAPS, PAR e cátions de metais de transição (M) em diversas proporções e concentrações, utilizando-se diferentes tampões e pHs, buscando-se encontrar uma reação colorimétrica adequada para quantificar CAPS. Os cátions metálicos testados foram Co²⁺, Cu²⁺ e Ni²⁺, que são amplamente utilizados em reações com PAR, formando complexos de coloração intensa, geralmente vermelha, solúveis em soluções aquosas. Devido à grande quantidade de dados adquiridos nesta etapa do trabalho apresentam-se neste tópico apenas os resultados mais relevantes.

Inicialmente apresentam-se os resultados obtidos de testes com extratos de pimenta-dedo-de-moça em cachaça, diluídos na proporção 50:50 v/v no respectivo tampão do estudo, e soluções de PAR e cátion metálico nas seguintes concentrações finais C_{PAR} 1,00×10⁻⁴ mol/L e C_M 5,00×10⁻⁵ mol/L.

Na tentativa de verificar se havia alguma interação entre PAR e CAPS estudaram-se os espectros eletrônicos das soluções de CAPS, PAR e da mistura PAR+CAPS. Os espectros eletrônicos obtidos em tampão borato pH 8,35 estão apresentados na Figura 39. Observou-se que não houve alteração significativa do perfil espectral da mistura PAR+CAPS quando comparada com os espectros eletrônicos de CAPS e PAR nas mesmas condições e concentrações, notando-se apenas a soma das absorbâncias dos espectros.

Para verificar se há alguma interação entre M e CAPS estudaram-se os espectros eletrônicos das soluções de CAPS, M e mistura M+CAPS. Os espectros eletrônicos das soluções de CAPS, Cu²⁺ e mistura Cu²⁺+CAPS obtidos em tampão acetato pH 3,78 estão apresentados na Figura 40.

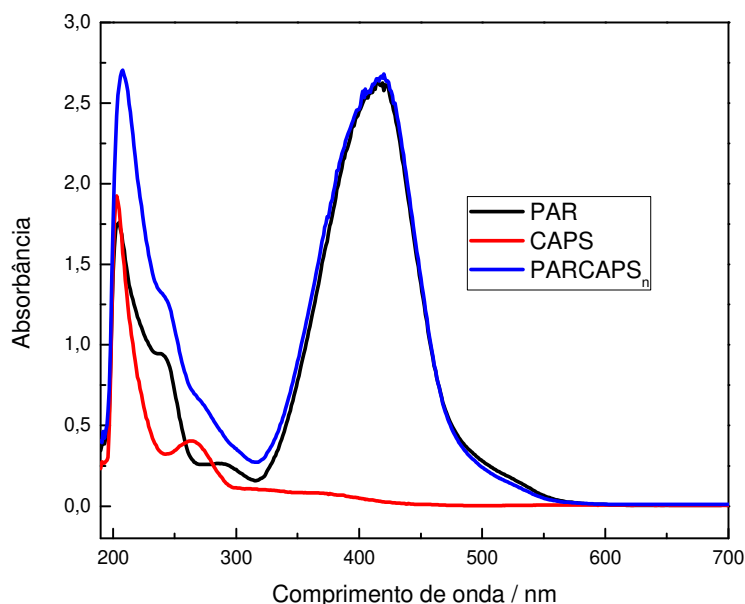


Figura 39. Espectros eletrônicos das soluções de CAPS e PAR e da mistura PAR+CAPS, em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cacheça 1:10 g/mL diluído em tampão borato pH 8,35 na proporção de 50:50 v/v. O branco utilizado foi aguardente:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.

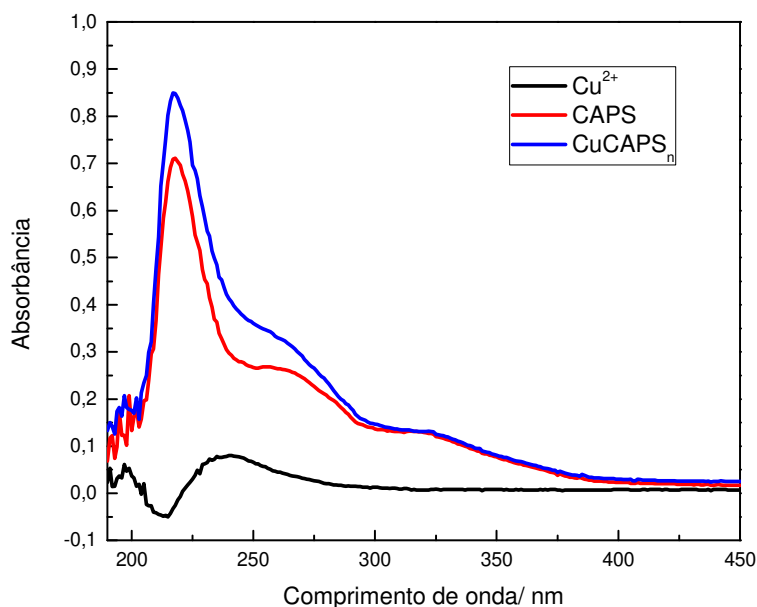


Figura 40. Espectros eletrônicos das soluções de CAPS e Cu²⁺ e da mistura Cu²⁺+CAPS, em tampão acetato pH 3,78, sendo $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cacheça 1:10 g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 50:50 v/v. O branco utilizado foi cacheça:solução aquosa pH 3,78 na proporção 15:85 v/v. A absorbância negativa do espectro de Cu²⁺ ocorreu devido ao uso do branco errado.

Nos espectros ilustrados na Figura 40, as absorbâncias em 220 e 260 nm de solução da mistura Cu+CAPS aumentaram com relação aos espectros de CAPS nas mesmas proporções. Isso poderia ser aplicado para quantificar CAPS, mas como a proposta inicial do trabalho era desenvolver um método na região VIS esta condição reacional não foi explorada. Além disso, muitas espécies absorvem na região UV, o que poderia implicar na necessidade de pré-tratamento das amostras para a separação dos interferentes comprometendo a simplicidade do método.

Sem resultados relevantes na região visível do espectro para misturas M+CAPS e/ou PAR+CAPS, estudaram-se os espectros eletrônicos das soluções de CAPS, M, PAR, MPAR_2 e misturas MPAR_2 +CAPS. Os espectros dessas misturas com soluções de Ni^{2+} em pH 8,35 estão apresentados na Figura 41.

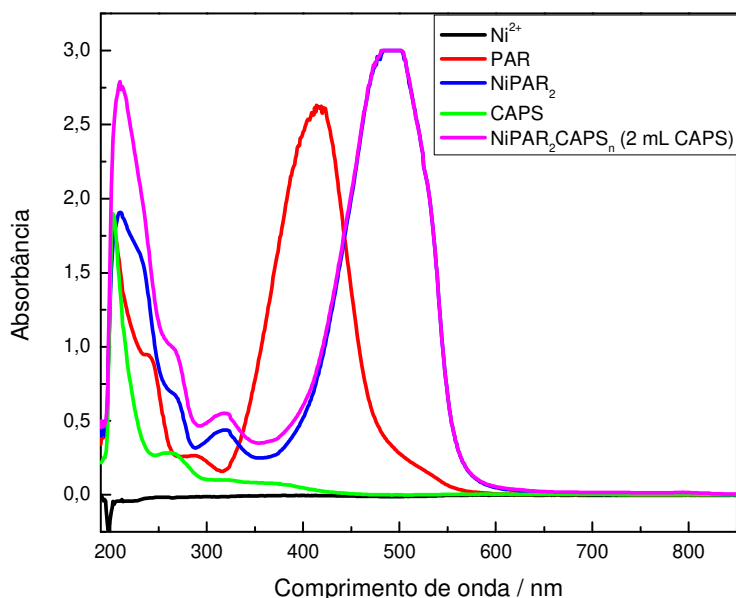


Figura 41. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{\text{PAR}} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{\text{Ni}^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{\text{CAPS}} = 2$ mL (inicial) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cacheça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cacheça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.

Novamente notou-se aumento de absorbância entre 270 e 320 nm com a presença de CAPS em solução. Comportamento análogo foi observado para Ni^{2+} em pH 7,35 (Figura 42), para Cu^{2+} em pHs 8,35 e 9,04 (Figuras 43 e 44) e para Co^{2+} em pHs 9,04 e 10,24 (Figuras 45 e 46). Como esses resultados não eram adequados para desenvolver método espectrofotométrico na região visível não foram explorados.

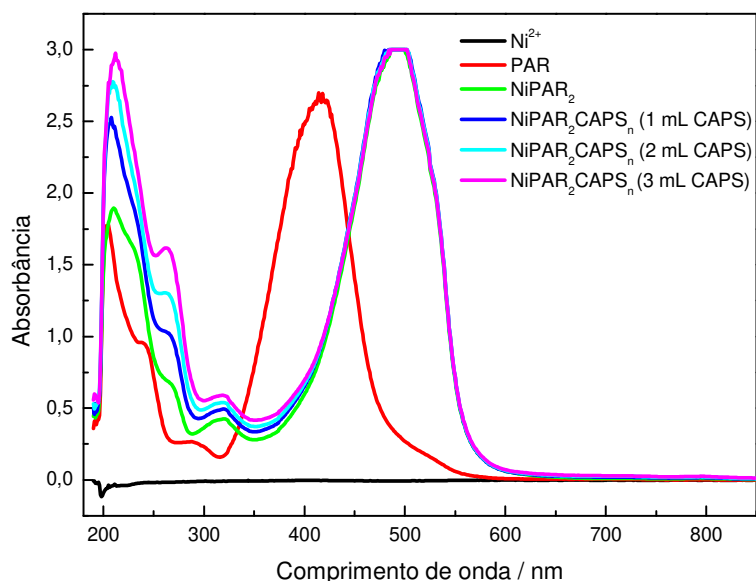


Figura 42. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 7,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Ni^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 7,35 na proporção 15:85 v/v.

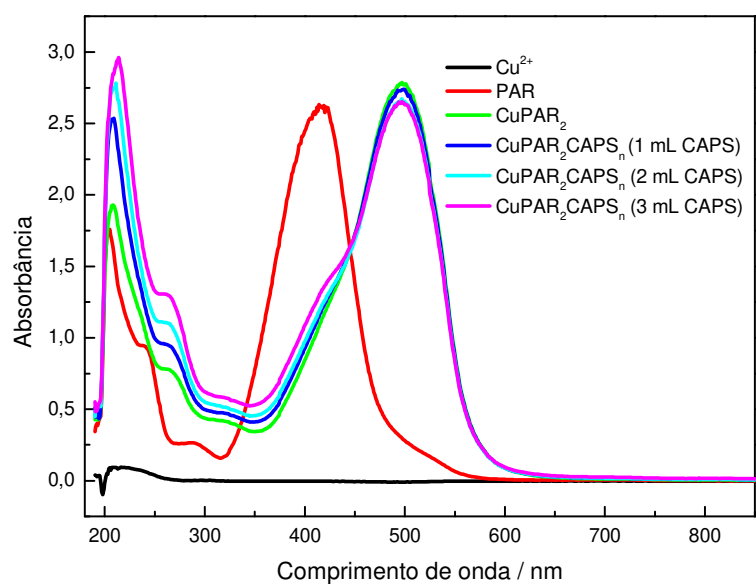


Figura 43. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 15:85 v/v.

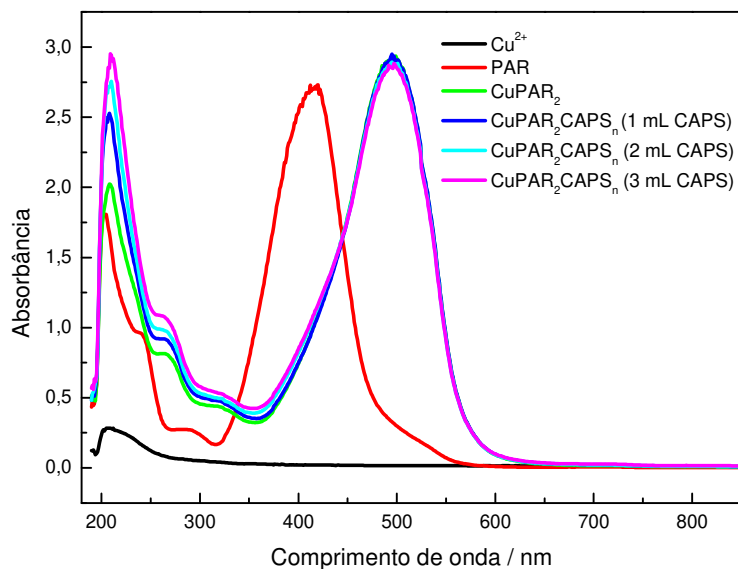


Figura 44. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 9,04, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Cu^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 9,04 na proporção 15:85 v/v.

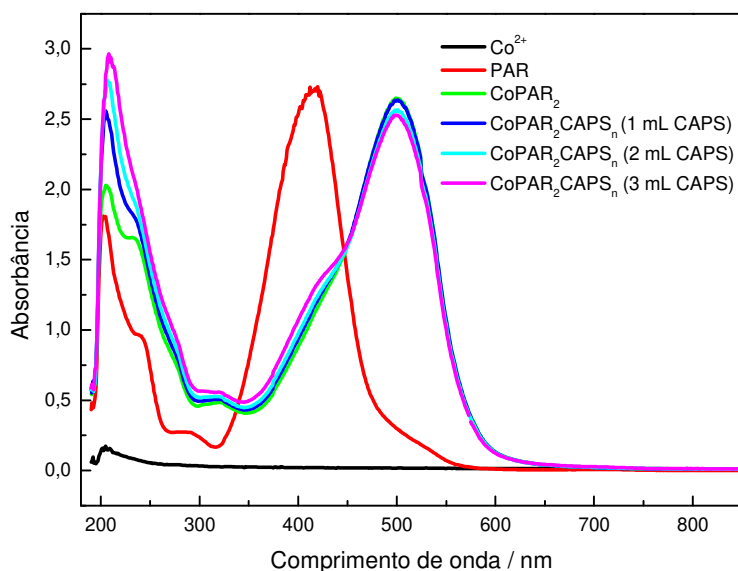


Figura 45. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão borato pH 9,04, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 9,04 na proporção 15:85 v/v.

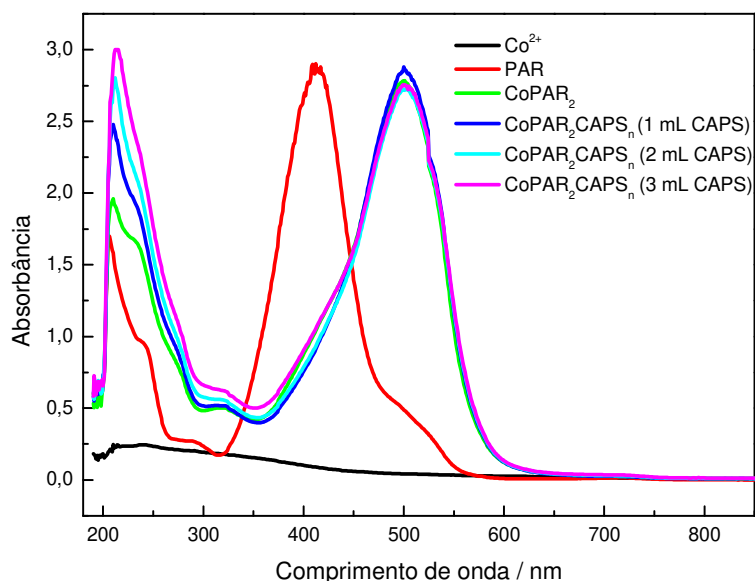


Figura 46. Espectros eletrônicos de soluções e misturas em tampão amônia pH 10,24, sendo $C_{PAR} = 1 \times 10^{-4}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 5 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $V_{CAPS} = 1, 2$ e 3 mL (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído em tampão na proporção de 50:50 v/v. Branco cachaça:solução aquosa pH 10,24 na proporção 15:85 v/v.

Em outra fase de trabalho, com estudo análogo, foram estudadas misturas com extratos de pimenta-dedo-de-moça em cachaça, e diluídos na proporção 80:20 v/v no respectivo tampão do estudo, além de soluções de PAR e cátion metálico nas seguintes concentrações finais $C_{PAR} 2,50 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_M 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L.

Os espectros eletrônicos para as misturas $CoPAR_2 + CAPS$ estão ilustrados na Figura 47.

A Figura 47 indica que com o aumento da C_{CAPS} há aumento da absorbância em 320 nm, ou seja, os CAPS favoreceram a formação de espécies com tal absorção e, também, redução da absorbância em 510 nm (máximo de absorção do complexo $CoPAR_2$) e aumento da absorbância em 420 nm (absorção típica de ligante PAR). Comportamento análogo foi observado para as misturas contendo Cu^{2+} em pH 8,35 (Figura 48).

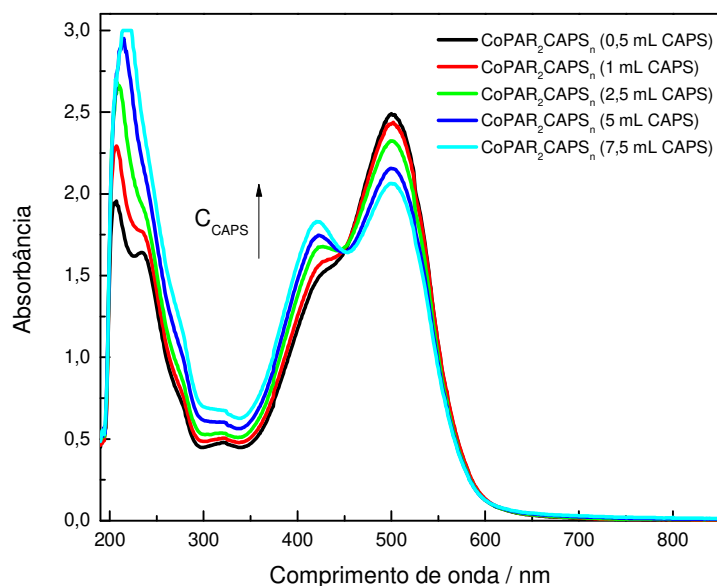


Figura 47. Espectros das misturas $\text{CoPAR}_2 + \text{CAPS}$ em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{\text{PAR}} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final), $C_{\text{Co}^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final) e $V_{\text{CAPS}} = 0,5, 1, 2,5, 5$ e $7,5 \text{ mL}$ (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 80:20 v/v. Branco: cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 24:76 v/v.

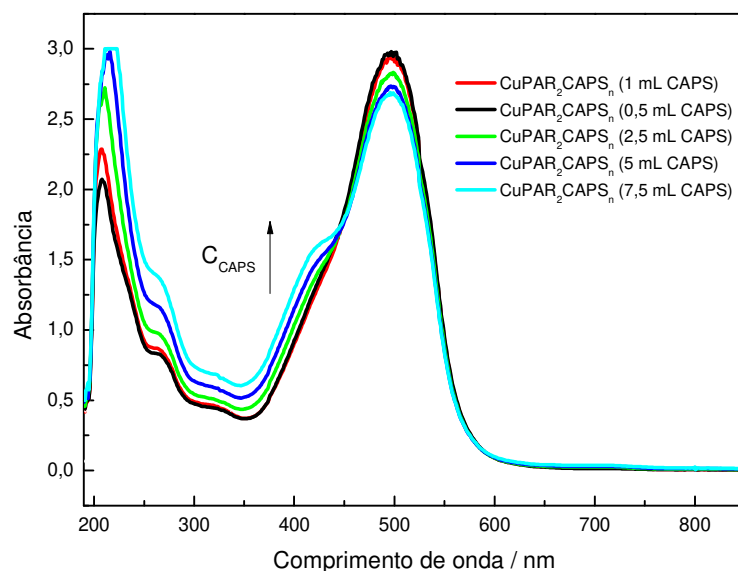


Figura 48. Espectros das misturas $\text{CuPAR}_2 + \text{CAPS}$ em tampão borato pH 8,35, sendo $C_{\text{PAR}} = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final), $C_{\text{Cu}^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final) e $V_{\text{CAPS}} = 0,5, 1, 2,5, 5$ e $7,5 \text{ mL}$ (iniciais) de extrato de pimenta dedo-de-moça de proporção inicial pimenta:cachaça 1:10 g/mL diluído no tampão de trabalho na proporção de 80:20 v/v. Branco: cachaça:solução aquosa pH 8,35 na proporção 24:76 v/v.

Estes comportamentos apontaram uma provável interação entre CAPS e os complexos de CuPAR₂ e CoPAR₂, favorecendo espécies com $\lambda_{\text{máx}}$ em 320 nm.

4.6.2. Estudo da Influência de CAPS no Complexo MPAR₂ em Cachaça

Na tentativa de simplificar a reação espectrofotométrica e, também, avaliar sobre outra perspectiva a mistura PAR+CAPS e a influência de CAPS sobre o complexo CoPAR₂, optou-se por substituir o tampão por cachaça como solvente majoritário. Optou-se pelo uso da cachaça como solvente majoritário, pois os resultados apontaram que os extratos em cachaça são mais estáveis. Além disso, trata-se de um solvente comum para obter extratos comestíveis, o que pode aproximar as condições de análise de condições de amostras comuns, como alguns molhos de pimentas comercializados.

Os espectros eletrônicos das misturas obtidas estão ilustrados na Figura 49.

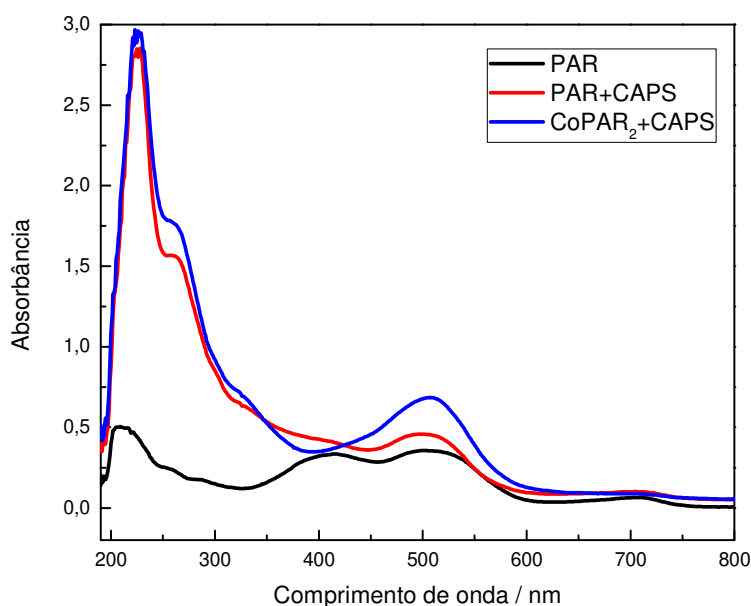


Figura 49. Espectros eletrônicos das misturas de soluções nas seguintes concentrações: $C_{\text{PAR}} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{\text{Co}^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{\text{CAPS}} = 0,024$ mg CAPS/g pimenta (final). O branco utilizado foi mistura cachaça:água 92:8 v/v.

As misturas PAR+CAPS e CoPAR₂+CAPS apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ em 510 nm, na região VIS do espectro, adequado para desenvolver o método espectrofotométrico como se pretendia inicialmente. Portanto, explorou-se trabalhar com misturas de soluções com C_{CAPS} entre 0,0001 e 0,36 mg CAPS/g pimenta nestas condições. A Figura 50 ilustra a tendência linear

de variação da absorbância em 510 nm observada para uma pequena faixa de C_{CAPS} adicionada a soluções de $CoPAR_2$.

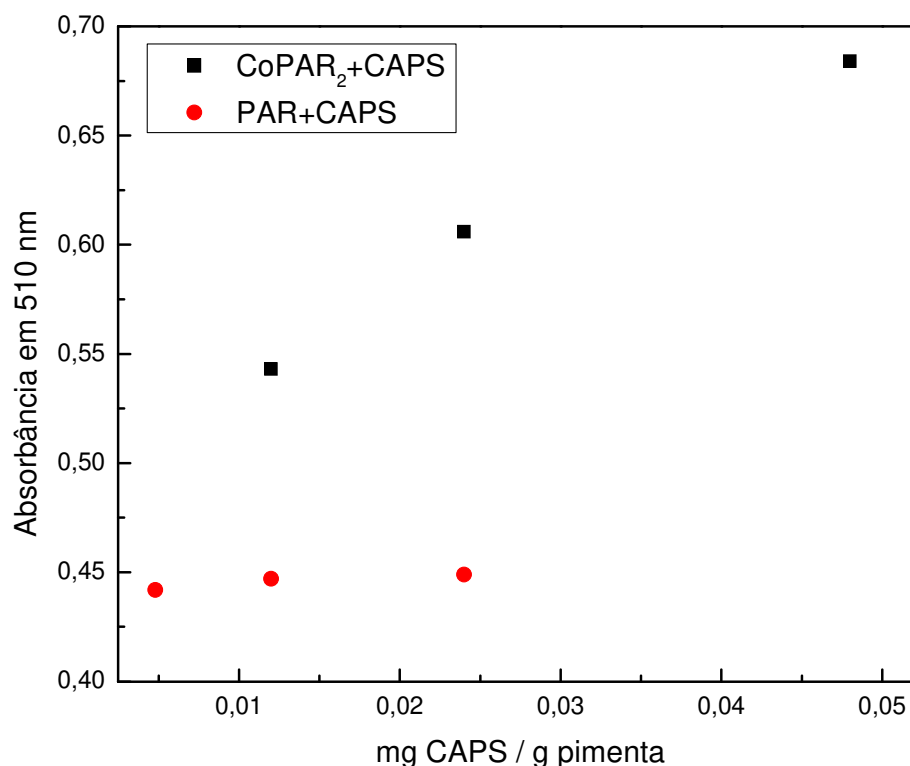


Figura 50. Absorbância em 510 nm em função de C_{CAPS} para as misturas $CoPAR_2+CAPS$ e $PAR+CAPS$, onde: $C_{PAR} = 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{Co^{2+}} = 1,25 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{CAPS} = 0,0048$ a $0,048$ mg CAPS/g pimenta (final). Branco: cachaça:água na proporção 92:8 v/v.

A intensidades de absorbância em 510 nm variou linearmente com relação à C_{CAPS} para as misturas $PAR+CAPS$ de $0,0048$ a $0,024$ mg CAPS/g pimenta, com coeficiente de correlação linear = $0,7166$. Já para $CoPAR_2+CAPS$, a faixa linear foi de $0,012$ a $0,048$ mg CAPS/g pimenta, com coeficiente de correlação linear = $0,9671$.

Os resultados obtidos com as misturas de $CoPAR_2+CAPS$ apresentaram melhor coeficiente de correlação linear e maior sensibilidade do que os obtidos das misturas $PAR+CAPS$, por isso o estudo para misturas $CoPAR_2+CAPS$ foi aprofundado.

Primeiramente, variou-se C_{PAR} e $C_{Co^{2+}}$ para encontrar um limite máximo de concentração e garantir a presença desses reagentes em excesso suficiente na mistura para garantir que a reação fosse completada em comparação com C_{CAPS} , sem, contudo atingir absorbâncias de $CoPAR_2$ muito elevadas. Isso deveria favorecer a resposta devida à interação de CAPS com o complexo $CoPAR_2$. A Figura 51 traz os espectros eletrônicos das misturas estudadas.

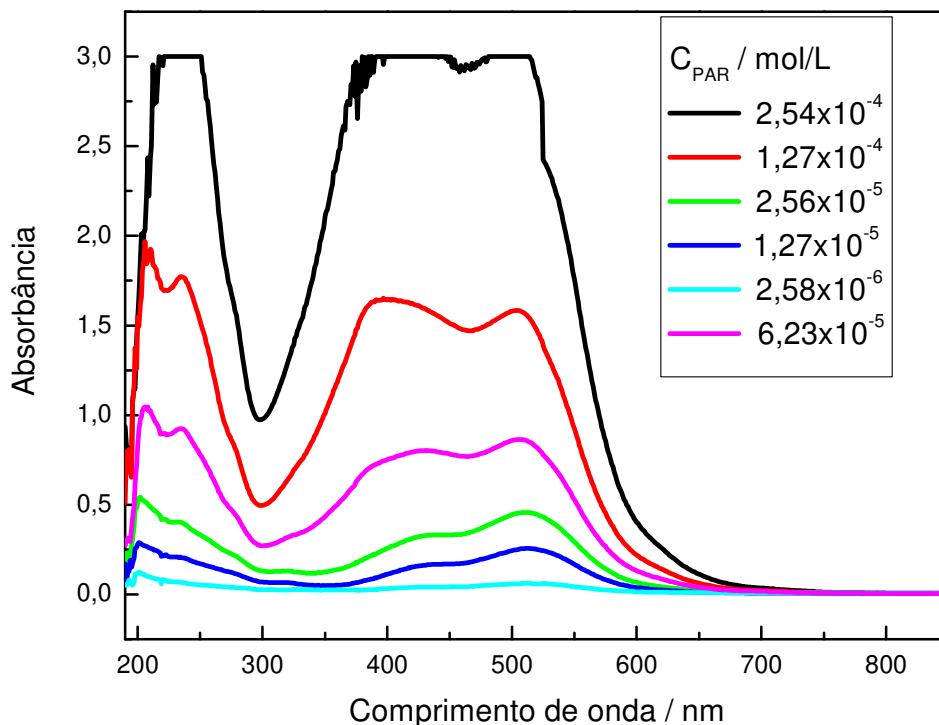


Figura 51. Espectros eletrônicos de CoPAR_2 em diferentes concentrações. Branco: cachaça:água na proporção 92:8 v/v.

Os resultados da Figura 51 orientaram a escolha de condições para tentar construir curva analítica sendo $C_{\text{PAR}} = 6,23 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{\text{Co}^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, mantendo-se a proporção molar 2:1 e medidas em $\lambda_{\text{máx}} = 510 \text{ nm}$.

4.6.3. Construção da Curva Analítica

Nesta etapa estudou-se efeito da C_{CAPS} nas misturas $\text{CoPAR}_2 + \text{CAPS}$ em cachaça para a construção da curva analítica para a quantificação de CAPS totais pelo método espectrofotométrico sendo que os espectros eletrônicos obtidos estão ilustrados na Figura 52.

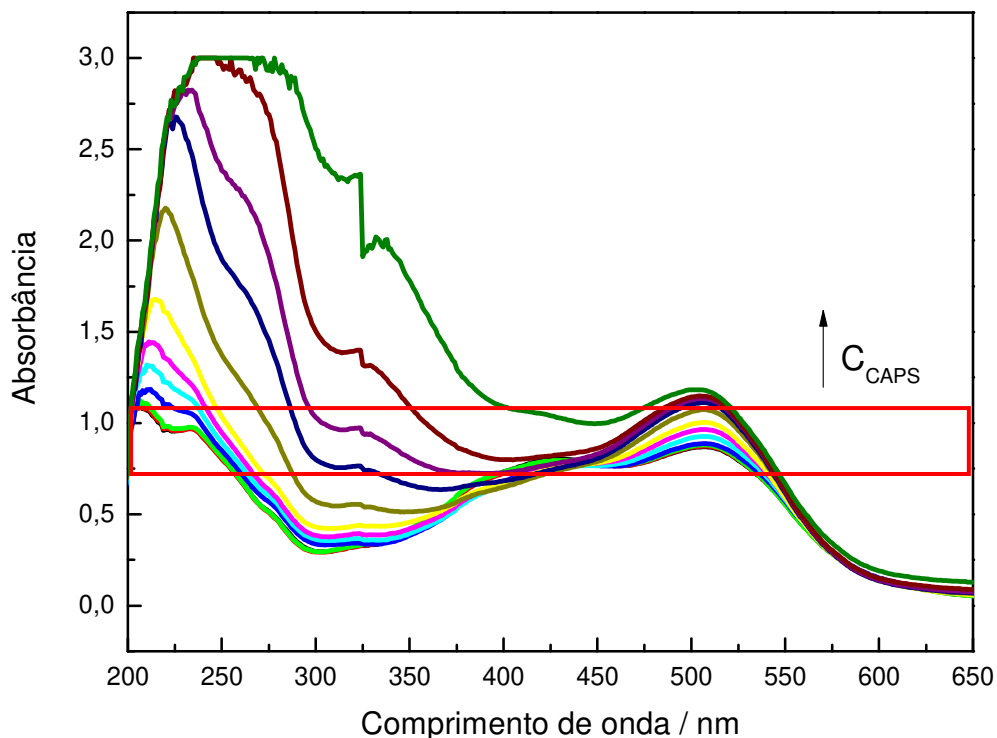


Figura 52. Espectros eletrônicos das misturas de CoPAR₂+CAPS com as seguintes concentrações finais: $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L e C_{CAPS} de 0,0003 a 0,6000 mg CAPS/g pimenta,. Branco: cachaça:água 92:8 v/v.

Nota-se que houve aumento da absorbância em 510 nm proporcional ao aumento de C_{CAPS} na mistura, ilustrado na Figura 53, que representa a curva analítica descrita pela Equação 3, com faixa linear de 0,001 a 0,03 mg CAPS/g pimenta e coeficiente de correlação = 0,9979, limite de detecção = 0,0004 mg CAPS/g pimenta e limite de quantificação = 0,001 mg CAPS/g pimenta. É conveniente destacar que a região da Figura 53 aplicada para a curva analítica teve absorbância unitária.

$$A_{510 \text{ nm}} = 0,90 + 6,63 \times C_{CAPS} \quad \text{Equação 3}$$

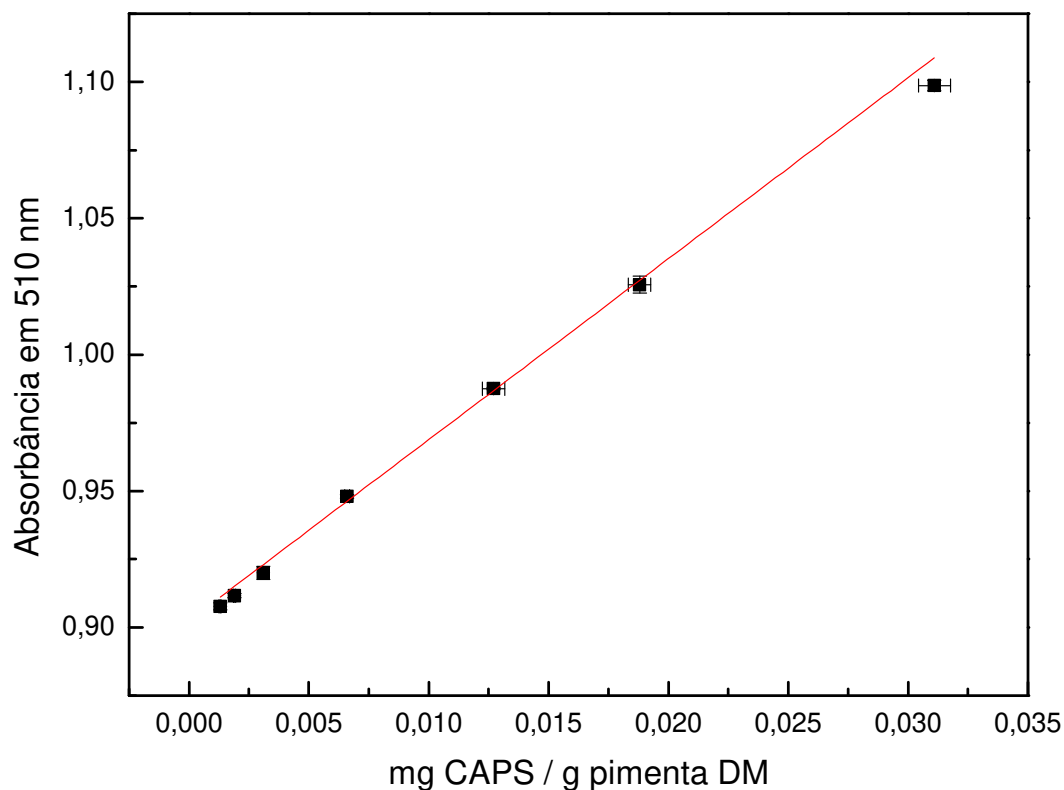


Figura 53. Curva analítica com as seguintes concentrações finais: $C_{PAR} = 6,23 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{Co^{2+}} = 3,10 \times 10^{-5}$ mol/L.

4.6.4. Comparação de Resultados de Quantificação

Tendo estabelecido as condições para a obtenção da curva analítica para o método VIS, determinou-se C_{CAPS} de algumas amostras de pimentas pelo método HPLC (itens 3.3.6.2 e 4.4) e pelo método espectrofotométrico, aplicando-se a Equação 4.

$$C_{amostra} = \left(\frac{(C_T \times V_T) (C_{DM} \times V_{DM})}{V_{ext}} \right) \times 10 \quad \text{Equação 4}$$

onde: C_T = C_{CAPS} total em solução; V_T = 25 mL; C_{DM} = C_{CAPS} no extrato padrão de pimenta dedo-de-moça; V_{DM} = 1 mL; V_{ext} = 3 mL e $C_{amostra}$ = C_{CAPS} na amostra em mg CAPS/g pimenta.

A Tabela 11 relaciona os resultados obtidos da quantificação das pimentas pelo método HPLC ($C_{CAPS/HPLC}$) e pelo método VIS ($C_{CAPS/VIS}$) e, também, as escalas Julie Cohn e Scoville, obtidas da literatura (VASCONCELOS, 2011).

Tabela 11. Quantificação dos extratos de pimentas *Capsicum* e dados da literatura.

Pimenta	mg CAPS / g pimenta		Julie Cohn*	Unidades Scoville*
	C _{CAPS/VIS}	C _{CAPS/HPLC}		
Americana	0,40±0,02	0,44±0,04	nenhuma	0
Cambuci	0,54±0,02	0,55±0,02	nenhuma	0
Poblano	0,55±0,02	0,65±0,03	suave	10-1500
Cascabel	0,64±0,01	0,77±0,02	média	1500-2500
Brinco-de-princesa	0,82±0,02	0,80±0,02	média	1500-15000
Serrano	0,86±0,01	0,84±0,01	média	5000-15000
Jalapeño	0,87±0,01	0,88±0,01	média	5000-15000
Culiacan	1,04±0,02	1,05±0,02	média	5000-15000
Murupi-verde	1,46±0,03	1,46±0,03	alta	50000-100000

*As escalas Julie Cohn e Scoville foram obtidas da literatura (VASCONCELOS, 2011)

Os resultados do método espectrofotométrico são estatisticamente semelhantes aos resultados obtidos pelo método HPLC com 95% de confiança, como indicam os dados da Tabela 12, calculados conforme procedimento recomendado por Skoog *et al.* (2011) e Baccan *et al.* (2003). Os dois conjuntos de resultados são proporcionais à resultados das escalas organolépticas em nível de picância disponíveis na literatura Vasconcelos (2011) conforme indicado na Tabela 11. Os resultados de C_{CAPS/HPLC} e C_{CAPS/VIS} calculados a partir de 6 replicatas para cada método foram submetidos ao teste F com nível de confiança de 95% ($F_{\text{crítico}} = 5,05$ de acordo com Skoog *et al.*, 2011), considerando-se 5 graus de liberdade, e encontrando-se precisão semelhante com 95% de confiança. O teste *t* pareado com 95% de confiança e 5 graus de liberdade ($t_{\text{crítico}} = 2,57$ de acordo com Skoog *et al.*, 2011), apontou que não há diferença significativa entre os resultados. Todo tratamento matemático destes testes estão detalhadamente descritos no Anexo 2.

Tabela 12. C_{CAPS} em pimentas *Capsicum* e valores calculados para teste F e teste *t* pareado.

Pimenta	Método	mg CAPS / g pimenta						F	t
		1	2	3	4	5	6		
Americana	VIS	0,43	0,35	0,42	0,41	0,43	0,37	2,25	-1,66
	HPLC	0,42	0,34	0,42	0,48	0,47	0,48		
Cambuci	VIS	0,53	0,50	0,56	0,59	0,55	0,52	1,23	-0,30
	HPLC	0,53	0,59	0,52	0,53	0,59	0,53		
Poblano	VIS	0,69	0,67	0,63	0,62	0,69	0,62	4,00	1,13
	HPLC	0,63	0,63	0,66	0,65	0,64	0,60		
Cascabel	VIS	0,77	0,72	0,78	0,81	0,77	0,78	1,33	-1,23
	HPLC	0,79	0,78	0,82	0,75	0,79	0,83		
Brinco de Princesa	VIS	0,82	0,83	0,84	0,80	0,79	0,85	1,00	2,15
	HPLC	0,78	0,79	0,83	0,78	0,81	0,82		
Serrano	VIS	0,83	0,88	0,85	0,87	0,86	0,85	1,00	2,50
	HPLC	0,83	0,85	0,85	0,86	0,84	0,81		
Jalapeño	VIS	0,87	0,88	0,85	0,88	0,89	0,87	2,09	-1,07
	HPLC	0,88	0,87	0,88	0,86	0,90	0,91		
Culiacan	VIS	1,04	1,03	1,05	1,09	1,01	1,02	1,78	-1,00
	HPLC	1,03	1,08	1,02	1,09	1,03	1,07		
Murupi Verde	VIS	1,49	1,48	1,45	1,47	1,48	1,41	1,82	0,28
	HPLC	1,45	1,41	1,49	1,49	1,42	1,48		

Como as escalas organolépticas trabalham com faixas de nível de picância, a quantificação pelo método VIS, nas condições estabelecidas, permite diferenciar pimentas *Capsicum* pertencentes a um mesmo grupo organoléptico, assim como o método HPLC. Entretanto, os níveis de CAPS variam com o genótipo, maturidade e são influenciados pelas condições de crescimento e perda após o processamento (ZEWDIE E BOSLAND, 2001). Portanto, para aplicar ambos os métodos instrumentais de quantificação (HPLC e VIS) é adequado considerar características como estação do ano, período do dia em que a colheita das pimentas foi realizada, local do plantio das pimenteiras e tudo mais que influencie no nível de picância dos frutos para servir como referência na comparação dos resultados.

4.6.5. Estequiometria da Espécie CoPAR₂CAPS_n

Para determinar a estequiometria da espécie CoPAR₂CAPS_n, formada utilizando cachaça como solvente majoritário e com máxima absorção em 510 nm, aplicou-se o método da variação contínua (SIROKI *et al*, 1975), descrito com detalhes no Anexo 3. O estudo foi

iniciado pela verificação da estequiometria do complexo CoPAR_2 , que serviu para indicar a adequação do procedimento já que sua estrutura é conhecida. Posteriormente, o método foi aplicado para determinar a estequiometria da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_n$.

Os resultados da determinação estequiométrica estão ilustrados para o complexo CoPAR_2 na Figura 54 e para a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAP}_n$ na Figura 55.

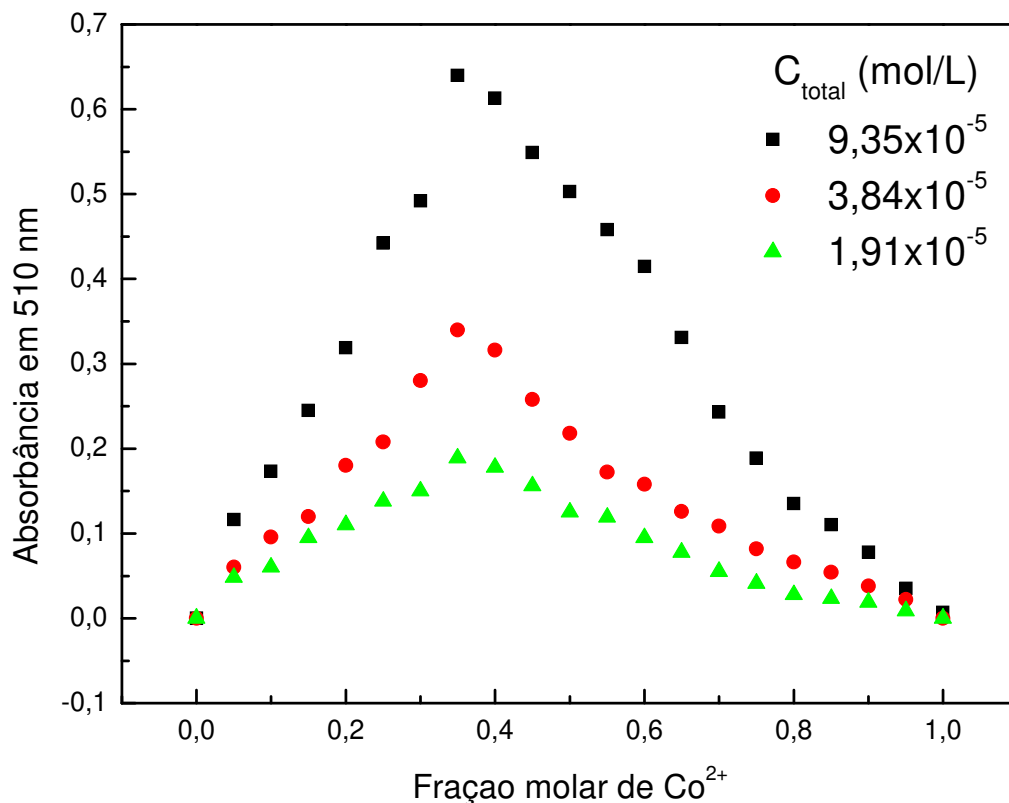


Figura 54. Dados para a determinação da estequiometria do complexo CoPAR_2 em cachaça pelo método da variação contínua, onde $C_{\text{total}} = C_{\text{PAR}} + C_{\text{Co}^{2+}}$.

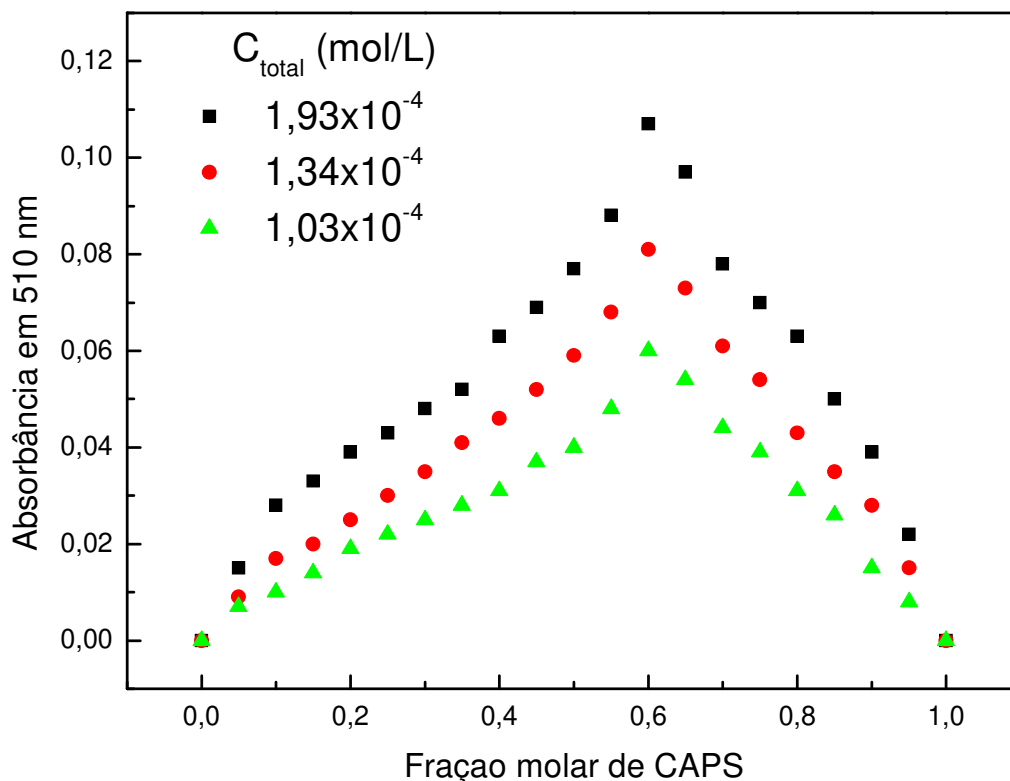


Figura 55. Dados para a determinação da estequiometria da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_n$ em cachaça pelo método da variação contínua, onde $C_{total} = C_{CAPS} + C_{[\text{CoPAR}_2]}$.

A absorbância máxima em 510 nm na Figura 54 ocorreu para a fração molar de $\text{Co}^{2+} = 0,35$, o que confirma a proporção estequiométrica de CoPAR_2 . Já para a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_n$, na Figura 55 pode-se notar que o máximo ocorreu para a fração molar de CAPS = 0,65, o que indica que a razão molar entre CAPS:PAR: Co^{2+} é 2:2:1, sugerindo a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$.

4.6.6. Estudo da Existência da Espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$

Tendo estabelecido a proporção estequiométrica da espécie como sendo $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ foi realizado um estudo para comprovar sua existência como espécie cromófora com máximo de absorção em 510 nm a partir de informações de extrações líquido-líquido com álcool isoamílico como solvente extrator. Para obter as informações necessárias, foram registrados os espectros eletrônicos das misturas preparadas em

cachaça e, após a extração, em álcool isoamílico, utilizando-se como branco os respectivos solventes. Foram feitas comparações do perfil espectral e da absortividade molar calculada para a espécie com absorção máxima na região de 510 nm, característica de $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, com dados nos dois solventes.

Os espectros registrados em cachaça estão ilustrados na Figura 56 e em álcool isoamílico na Figura 57.

As absortividades molares (ϵ) da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, em cachaça e em álcool isoamílico foram estimadas através da Equação 5.

$$\epsilon = \frac{A_{\lambda_{\text{máx}}}}{b \times \frac{C_{\text{CAPS}}}{2}} \quad \text{Equação 5}$$

onde: A = absorbância ($\lambda_{\text{máx}} = 510$ nm para cachaça e 520 nm para álcool isoamílico); b = 1 cm de caminho óptico e C_{CAPS} = concentração de CAPS em mol/L.

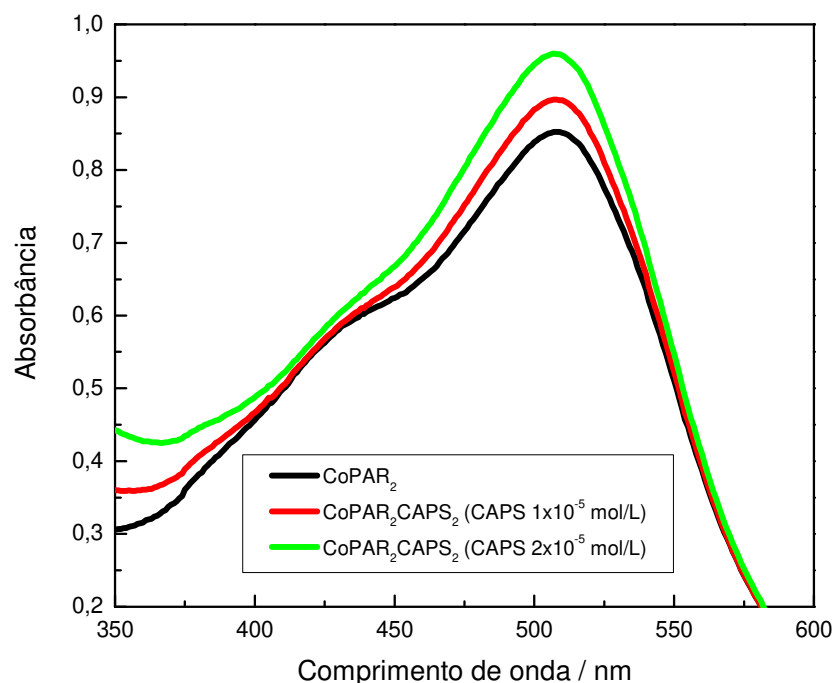


Figura 56. Espectros eletrônicos para as misturas CoPAR_2 e $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ em cachaça, com $C_{\text{PAR}} = 6,21 \times 10^{-5}$ mol/L (final), $C_{\text{Co}^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5}$ mol/L (final) e $C_{\text{CAPS}} = 1 \times 10^{-5}$ e 2×10^{-5} mol/L (final). O branco utilizado foi cachaça.

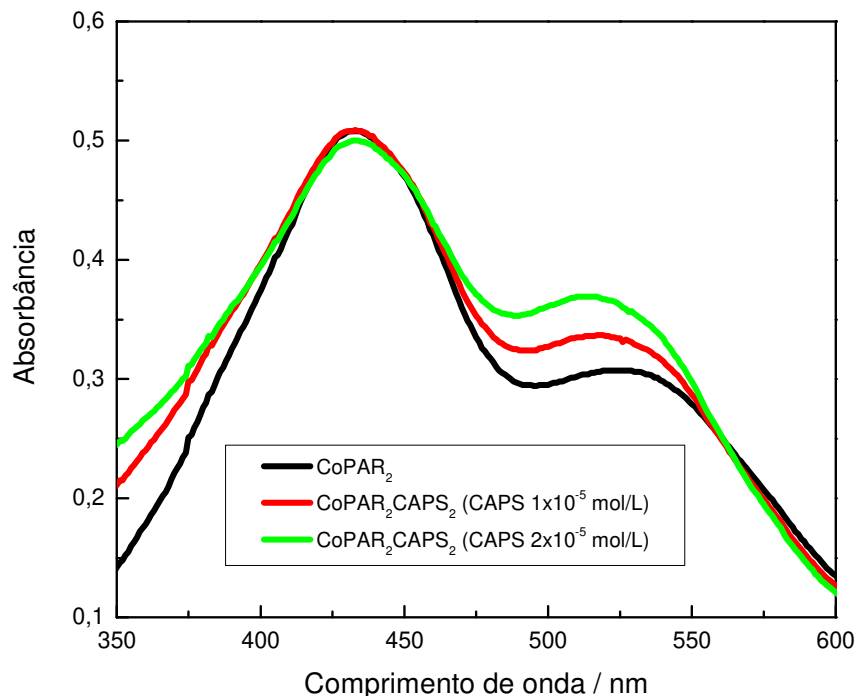


Figura 57. Espectros eletrônicos para as misturas CoPAR_2 e $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, em álcool isoamílico, com $C_{\text{PAR}} = 6,21 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final), $C_{\text{Co}^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (final) e $C_{\text{CAPS}} = 1 \times 10^{-5}$ e $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (finais). O branco utilizado foi álcool isoamílico.

Nota-se nos espectros eletrônicos que houve deslocamento do máximo de absorvância da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ de 510 nm em cachaça para 520 nm em álcool isoamílico, como seria esperado devido o uso de diferentes solventes. O valor de ϵ estimado para a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ em cachaça é maior que em álcool isoamílico, $1,4 \pm 0,6 \times 10^5 \text{ L/mol.cm}$ e $5,2 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ L/mol.cm}$, respectivamente, justifica as menores intensidades de absorção em 520 nm em álcool isoamílico quando comparadas com 510 nm em cachaça. Além disso, há variação do perfil espectral com deslocamento e melhor definição de $\lambda_{\text{máx}}$ do PAR (420 nm em cachaça para 430 nm em álcool isoamílico). Tudo isso pode ser observado nas Figuras 56 e 57.

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que existe a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ resultado da interação do complexo CoPAR_2 , com duas unidades de CAPS, pois o aumento de absorvância na região entre 510 e 520 nm é proporcional à C_{CAPS} para ambos os solventes, sugerindo tratar-se, portanto, da mesma espécie cromófora.

Na tentativa de estabelecer a estrutura da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$ foram realizados estudos envolvendo o registro de espectros de infravermelho por transmissão e por reflectância total atenuada (ATR) de misturas $\text{CAPS}+\text{CoPAR}_2$ e das soluções CoPAR_2 , PAR , Co^{2+} e CAPS com concentrações finais $C_{\text{PAR}} = 6,21 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $C_{\text{Co}^{2+}} = 3,12 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{\text{CAPS}} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Os resultados obtidos não foram conclusivos, provavelmente por se ter trabalhado com concentrações muito baixas para as técnicas aplicadas.

Outro estudo envolveu o registro de espectros de massas através da infusão direta no sistema MS, descrito no item 3.3.2, de misturas $\text{CAPS}+\text{CoPAR}_2$ e das soluções CoPAR_2 . Também neste caso não foram obtidos resultados conclusivos, provavelmente devido à fragmentação das espécies monitoradas no cone de ionização ou à não protonação das espécies que, sem carga, não foram detectadas.

Embora a elucidação da estrutura da espécie cromófora não seja indispensável para sua aplicação analítica e os resultados obtidos não tenham sido conclusivos, é possível apresentar uma proposta de estrutura para a espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, indicada na Figura 58. Isto pode servir para estudos posteriores de eventuais interessados.

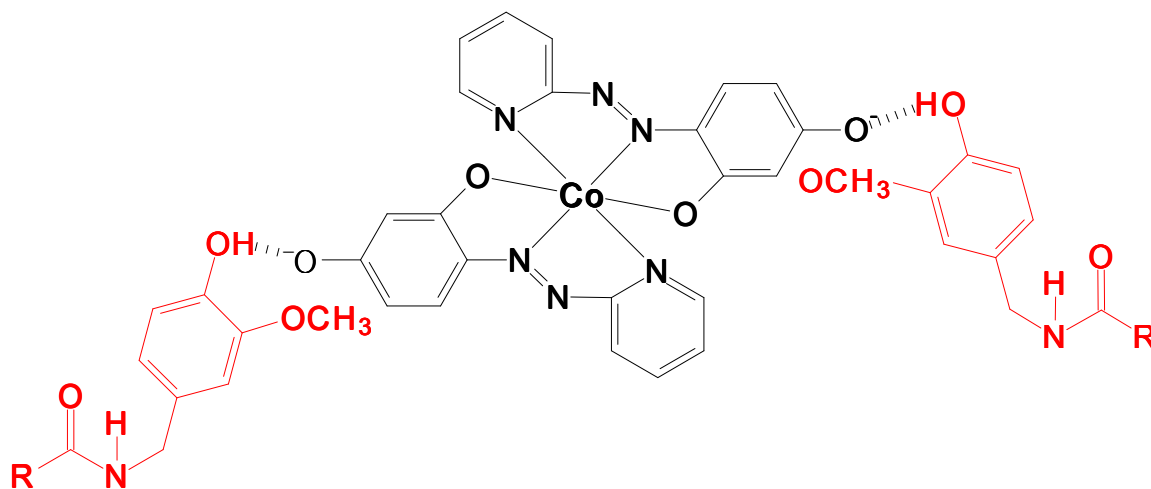


Figura 58. Proposta para a estrutura da espécie $\text{CoPAR}_2\text{CAPS}_2$, onde há interação por ligação de hidrogênio entre CoPAR_2 e CAPS .

Capítulo 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho permitem concluir que:

A reação colorimétrica entre as misturas CAPS+MPAR₂ utilizando diferentes tampões e pHs como solvente, apresentou os melhores resultados em tampão borato pH 8,35 para Co²⁺ e Cu²⁺, onde as misturas apresentaram espectros com absorção em 510 nm inversamente proporcional a C_{CAPS}. Porém, utilizando cachaça como solvente majoritário para misturas CAPS+CoPAR₂ os espectros apresentaram absorção em 510 nm proporcional a C_{CAPS}, o que garantiu maior simplicidade ao método proposto. A curva analítica para misturas CAPS+CoPAR₂ em cachaça apresentou faixa linear entre 0,001 e 0,03 U, limite de detecção = 0,0004 U e limite de quantificação = 0,0005 U (sendo U = mg CAPS/g pimenta) e coeficiente de correlação = 0,9979.

A proporção estequiométrica determinada para o produto formado foi CoPAR₂CAPS₂ e a extração líquido-líquido comprovou sua existência como uma nova espécie cromófora.

Para validar laboratorialmente o método espectrofotométrico proposto, compararam-se os resultados de quantificação de CAPS totais em extratos de *Capsicum* obtidos pelo método VIS com resultados obtidos por método HPLC e não foram encontradas diferenças significativas com 95% de confiança. Além disso, esses resultados são proporcionais aos resultados das escalas organolépticas Julie Cohn e Scoville, publicados na literatura.

O processo de extração de CAPS foi aperfeiçoado visando simplicidade de processo e uniformidade de resultados, sem a preocupação de se atingir extração exaustiva. Os extratos mais estáveis foram obtidos usando cachaça como solvente extrator e as condições aperfeiçoadas para extração de CAPS envolvem utilizar pimentas fatiadas finamente, com sementes e sem pedúnculo, na proporção de 30 g pimenta para 50 mL de cachaça, mantidos sob agitação mecânica durante 30 min, seguindo-se filtração simples e repouso por 10 min.

O acompanhamento da variação de C_{CAPS} durante o amadurecimento das pimentas apontou que C_{CAPS} aumenta à medida que o estágio de maturação é completado e a ordem de picância estabelecida pelos métodos organolépticos só é proporcional à C_{CAPS} de pimentas maduras.

A análise da variação de C_{CAPS} em pimentas armazenadas em $-11^{\circ}C$ apontou que C_{CAPS} diminuiu significativamente após 3 meses de estocagem dos frutos e, portanto, este período foi considerado como máximo para armazenamento das pimentas sob tal condição.

Capítulo 6. TRATAMIENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados corretamente de acordo com as normas da Comissão de segurança do IQ-UNICAMP.

As soluções ácidas ou básicas sem íons tóxicos foram descartadas na pia após neutralização.

O metanol foi armazenado em frascos adequados e submetido à Comissão de Segurança para enviá-lo oportunamente para incineração.

As soluções contendo os íons de metais pesados Co^{2+} , Cu^{2+} e/ou Ni^{2+} foram armazenadas em recipientes adequados, tratadas pela técnica de nível superior do GPQUAE, Acácia Adriana Salomão, e posteriormente encaminhadas para tratamento final na Central de Comissão de Segurança seguindo-se as recomendações descritas nas referências abaixo:

- ✓ Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, Committee of Hazardous Substances in the Laboratory, Washington D.C., National Academy Press, **1983**.
- ✓ Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual, Japan, International Technical Information Institute, **1982**.

Capítulo 7. PERSPECTIVAS

A quantificação de CAPS totais em extratos de pimentas é de interesse para implementação de processo industrial, sendo, portanto, pertinente elaborar um protocolo de análise para aplicação em análises de rotina para controle da qualidade dos extratos com o método desenvolvido.

As dificuldades de quantificação de CAPS individuais por espectrofotometria e por HPLC devido à semelhança dos espectros e à coeluição dos CAPS, respectivamente, podem vir a ser superadas com a aplicação de procedimentos envolvendo técnicas de espectrometria de massas, o que poderá ser realizado no GPQUAE em trabalhos futuros.

A aplicação de métodos quimiométricos pode ser introduzida para estimar parâmetros de classificação de extratos e fontes de CAPS, cujo potencial de aplicação em diversos segmentos industriais certamente estimula novos estudos, inclusive para prospecção de novas espécies para exploração comercial, como está sendo iniciado em trabalho de outro membro do grupo.

Capítulo 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, B. D.; "Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties of garlic and onions"; *Nutrition & Food Science*; 37; 178-183; 2007.

AHUJA, K. D.; "Effects of chilli consumption on postprandial glucose, insulin and energy metabolism"; *Journal of Clinical Nutrition*; 84; 63-69; 2006.

AMARAL, L.; "A Química – 50 Palavras"; São Paulo; Editora Loyola; 1995.

ANAN, T.; ITO, H.; MATSUNAGA, H.; MONMA, S.; "A simple method for determining the degree of pungency of peppers"; *Capsicum and Eggplant Newsletter*; 16; 61-64; 1996.

ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; NAVEENKUMAR, C.; ASOKKUMAR, S.; DEVAKI, T.; "Capsaicin alleviates the imbalance in xenobiotic metabolizing enzymes and tumor markers during experimental lung tumorigenesis"; *Molecular and Cellular Biochemistry*; 331; 135–143; 2009.

AYAD, M. M.; KHAYYAL, S. E.; FARAG, N. M.; "GLC and colorimetric methods for the determination of capsaicin"; *Analytical Letters*; 18; 793-802; 1985.

BACCAN, N.; ANDRADE J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S.; "Química Analítica Quantitativa Elementar"; São Paulo; Editora Edgard Blucher; 2003.

BAJAJ, K. L.; "Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits"; *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*; 63; 1314-1316, 1980.

BAJAJ, K. L.; KAUR, G.; "Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits with the Folin-Ciocalteu reagent"; *Mikrochimica Acta*; 1; 81-86; 1979.

BARBERO, G. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G.; "Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers"; *Talanta*; 75; 1332-1337; 2008.

BARBERO, G. F.; PALMA, M.; BARROSO, C. G.; a) "Pressurized Liquid Extraction of Capsaicinoids from Peppers"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 54; 3231-3236; 2006.

BARBERO, G. F.; PALMA, M.; BARROSO, C. G.; b) "Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction– High-performance liquid chromatography with fluorescence detection"; *Analytica Chimica Acta*; 578; 227-233; 2006.

BINSHTOK, A. M.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J.; "Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers"; *Nature*; 10; 449-607; 2007.

BODUSZ JÚNIOR, S.; KETZER, D. C. M.; GUBERT, R.; ANDRADES, L.; GOBO, A. B.; "Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil"; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; 26; 793-798; 2006.

BONTEMPO, M.; "Pimenta e seus benefícios"; São Paulo; Editora Alaúde, 2007.

BOONKIRD, S.; PHISALAPHONG, C.; PHISALAPHONG, M.; "Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab-and pilot-plant scale". *Ultrasonics Sonochemistry*; 15; 1075-1079; 2008.

BUTTERY, R. G.; SEIFFERT, R. M.; GUADAGNI, D.; LING, L. C.; "Characterization of some volatile constituents of bell peppers"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 17; 1322-1327; 1969.

- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; “Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil”; Brasília; Editora Embrapa Hortaliças, 2006.
- CHENG, K. L.; UENO, K.; IMAMURA, T.; “*CRC Handbook of Organic Analytical Reagents*”; Boca Raton; CRC Press; 1982.
- CONTRERAS-PADILLA, M.; YAHIA, E. M.; “Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46; 2075-2079; 1998.
- COOPER, T. H.; GUZINSKI, J. A.; FISHER, C.; “Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in *Capsicum* oleoresins”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 39; 2253-2256; 1991.
- COUTEUR, P. L.; BURRESON, J.; “Os Botões de Napoleão – As 17 moléculas que mudaram a história”; Rio de Janeiro; Editora Jorge Zahar Ltda; 2006.
- DAOOD, H. G.; ILLE'S, V.; GNAYFEED, M. H.; MÉSZARÓS, B.; HORVÁTH, G.; BIACS, P.A.; “Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane”. *Journal of Supercritical Fluids*; 23; 143–152; 2002.
- EDITORA INSUMOS. Conservantes usados em cosméticos. *Cosméticos e Perfumes*; 44; 2007. Disponível em: http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n%2044.pdf, acessado em maio de 2012.
- FELLOWS, P. J.; “*Tecnologia do processamento de alimentos – Princípios e práticas*”; tradução: OLIVEIRA, F. C.; RUBENSAN, J. M.; NITZKE, J. A.; THYS, R. C. S.; São Paulo; Editora Artmed; 2006.
- FLASCHKA, H. A.; BARNARD, Jr. A. J.; “*Chelates in Analytical Chemistry – A collection of Monographs*”; New York; Marcel Dekker; 1972.
- GOVINDARAJAN, V. S.; “*Capsicum – production, technology, chemistry and quality. Part II Processed products, Standards, world production and trade*”; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 24; 245-345; 1986.
- HAWER, W. S.; HA, J.; HWANG, J.; NAM, Y.; “Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography”; *Food Chemistry*; 49; 99-103; 1994.
- HUANG, J.; MABURY, S. A.; SAGEBIEL, J. C.; “Hot Chili Peppers: Extraction, Cleanup, and Measurement of Capsaicin”; *Journal of Chemical Education*; 77; 1630; 2000.
- International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC: <http://old.iupac.org/goldbook/A00220.pdf>, acessado em abril de 2012.
- IWAI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWAKE, H.; OHA, S.; “Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry”; *Journal of Chromatography*; 172; 303-311; 1979.
- KARNKA, R.; RAYANAKORN, M.; WATANESK, S.; VANEESORN, Y.; “Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Parameters for the Determination of Capsaicinoid Compounds Using the Simples Method”; *Analytical Sciences*; 18; 661-665; 2002.

- KASBIA, S. G.; "Functional Foods and nutraceuticals in the management of obesity"; *Nutrition & Food Science*; 35; 344-352; 2005.
- KIRSCHBAUM-TITZE, P.; HIEPLER, C.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M.; "Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of Capsaicinoid Content Following Cellular Disruption"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50; 1260-1263; 2002.
- KOREL, F.; BAGDATLIOGLU, N.; BALABAN, M. O.; HISIL, Y.; "Ground Red Peppers: Capsaicinoids Content, Scoville Scores, and Discrimination by an Electronic Nose"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50; 3257-3261; 2002.
- KOSUGE, S.; FURUTA, M.; "Studies on the pungent principle of *Capsicum*"; *Agricultural and Biological Chemistry*; 34; 248-256; 1970.
- KOZUKUE, N.; HAN, J.; KOZUKUE, E.; LEE, S.; KIM, J.; LEE, K.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M.; "Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing food by High – Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography – Mass Spectrometry"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53; 9172-9181; 2005.
- KRAJEWSKA, A. M.; POWERS, J. J.; "Gas chromatographic determination of capsaicinoids in Green *Capsicum* fruits"; *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*; 70; 926-928; 1987.
- KULKA, K.; "Aspects of functional groups and flavour"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 15; 48-57; 1967.
- LASKARIDOU-MONNERVILLE, A.; "Determination of capsaicinoid dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to various species of *Capsicum*, Solanaceae"; *Journal of Chromatography A*; 838; 293-302; 1999.
- LINGUANOTTO NETO, N.; "*Dicionário Gastronômico: Pimentas com suas receitas*"; São Paulo; Editora Boccato; 2004.
- Lista de Produtos Controlados: http://www.dga.unicamp.br/Documentos/PDF/Produtos_Controlados_PC.pdf; acessado em maio de 2012.
- LUNN, J. "Nutrição e envelhecimento saudável"; *Nutrição em Pauta*; 85, 5-9; 2007.
- MACRAE, R. (ed.); ROBINSON, R. K. (ed.); SADLER, M. J. (ed.); "*Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition (Peppers and Chillies)*"; London; Academic Press; 3496-3505; 1993.
- MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA-HERREO, N.; VARA, D.; DÍAZ-LAVIADA, I.; "Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells"; *FEBS Letters*; 583; 141-147; 2009.
- MANDAL, S.; POONAM, S.; HORE, D. K.; "A colorimetric method for estimation of capsaicin in chilli fruits"; *Indian Journal of Plant Genetic Resources*; 11; 213-218; 1998.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P.; "Pungency principles in *Capsicum*, analytical determinations and toxicology"; In: DE, A. K.; ed., "*Capsicum: The genus Capsicum*"; London; Taylor & Francis; 2003.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P.; "Solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric determination of capsaicin and some of its

- analogues from chilli peppers (*Capsicum ssp.*); *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*; 82; 1399-1405; 1999.
- MARKOVITS, E.; GILHAR, A.; "Capsaicin: an effective topical treatment in pain"; *International Journal of Dermatology*; 36; 401-404; 1997.
- MORI, A.; LEHMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J. C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W. H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H. P.; "Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells"; *Cancer Research*; 66; 3222-3229; 2006.
- NORTH, H.; BAYONNE, N. J.; "Colorimetric Determination of Capsaicin in Oleoresin of Capsicum"; *Analytical Chemistry*; 21; 934-936; 1949.
- PALECEK, F.; SANT'AMBROGIO, G.; SANT'AMBROGIO, F.; "Reflex responses to capsaicin intravenous, aerosol and intratracheal administration"; *Journal of Applied. Physiology*; 67; 1428-1437; 1989.
- PEÑA-ALVAREZ, A.; RAMÍREZ-MAYA, E.; ALVARADO-SUÁREZ, L. A.; "Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry"; *Journal of Chromatography A*; 1216; 2843–2847; 2009.
- PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B.; "Buffers for pH and Metal Ion Control"; London; John Wiley & Sons; 1979.
- PERUCKA, I.; OLESZEK, W.; "Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography"; *Food Chemistry*; 71; 287-291; 2000.
- PEUSCH, M.; MÜLLER-SEITZ, E.; PETZ, M.; MÜLLER, A.; ANKLAM, E.; "Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.) using supercritical fluids and organic solvents"; *Z Lebensm Unters Forsch A*; 204; 351-355; 1997.
- PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A.; "Origem, produção e composição química da cachaça"; *Química Nova na Escola*; 18; 3-8; 2003.
- PRUTHI, J. S.; "Chemistry and quality control of Capsicums and Capsicum products", In: DE, A. K.; ed., "Capsicum: The genus Capsicum"; London; Taylor & Francis; 2003.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B.; "Capsicum: Pimentas e pimentões no Brasil"; Brasília; Editora Embrapa Hortaliças; 2000.
- REILLY, C. A.; CROUCH, D. J.; YOST, G. S.; "Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin, capsicum and pepper spray products"; *Journal of Forensic Science*; 43; 502-509; 2001.
- REILLY, C. A.; CROUCH, D. J.; YOST, G. S.; FATAH, A. A.; "Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry"; *Journal of Chromatography A*; 912; 259-267; 2001.
- SALGADO-ROMAN, M.; BOTELLO-ÁLVAREZ, E.; RICO-MARTÍNEZ, R.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; CÁRDENAS-MANRIÍQUEZ, M.; NAVERRETE-BOLAÑOS, J.; "Enzymatic Treatment To Improve Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili (*Capsicum annuum*) Fruits"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56; 1012–1018; 2008.

- SATAMARÍA, R. I.; REYES-DUARTE, M. D.; BÁRZANA, E.; FERNANDO, D.; GAMA, F. M.; MOTA, M.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; "Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annuum* L.) Using Ethanol as Solvent". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48; 3063-3067; 2000.
- SIROKI, M.; MARIC, Z.; STEFANAC, M.; HERAK; "Caracterization of complexes involved in the spectrophotometric determination of cobalt with 4-(2-pyridyl-azo)resorcinol"; *Journal Chimica Acta*; 75; 101-109; 1975.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; "Fundamentos de Química Analítica "; São Paulo; Cengage Learning; 2011.
- SURH, Y.; "More Than Spice: Capsaicin in Hot Chili Peppers Makes Tumor Cells Commit Suicide"; *Journal of the National Cancer Institute*; 94, 1263-1265; 2002.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M.; "Vanilloid (*Capsicum*) receptor and mechanisms"; *Pharmacological Reviews*; 31; 139-212; 1999.
- TING, S. V.; BARRONS, K. C.; "A chemical test for pungency in peppers"; *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*; 40; 504-508; 1942.
- USP 28, "The United States Pharmacopeia (USP 28), 28th revision and The National Formulary (NF 23)", 23th edition; New York,. CRC Press, 337; 2005.
- VASCONCELOS, C.; "*Pimentas que você encontra em São Paulo*"; São Paulo; Editora do Autor; 2011.
- VESALUOMA, M.;MÜLLER, L.;GALLAR, J.;LAMBIASE, A.;MOILANEN, J.; HACK, T.;BELMONTE, C.;TERVO, T.; "Effects of Oleoresin *Capsicum* Pepper Spray on Human Corneal Morphology and Sensitivity"; *Journal of Investigative and Visual Science*; 41; 2138-2147; 2000.
- YANYING, Z.; "Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits"; *Journal of the Hebei Academy of Sciences*; 33; 1-9; 1988.
- YAO, J.; NAIR, M. G.; CHANDRA, A.; "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annuum*) and Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 42; 1303-1305; 1994.
- ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P. W.; "Capsaicinoids profiles are not good chemotaxonomic indicators for capsaicin species"; *Biochemical Systematics and Ecology*; 29; 161-169; 2001.

ANEXOS

Anexo 1: Etiquetas dos registros das exsiccatas das pimentas

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149514 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Americana; origem: Brasil; ardência: nenhuma; comprimento do fruto: 18 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 27 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 150803 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: pimenta balão; folhas de coloração verde escuro e tamanho médio; frutos pendentes, de formato piramidal; flores de 6 pétalas separadas totalmente, brancas com estames azuis; ardência: alta; comprimento do fruto: 3 cm; cor: vermelho quando maduros. Souza, P. T. 3 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149522 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Bhut Jolokia; origem: Índia; ardência: alta; comprimento do fruto: 8 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro; atualmente, a pimenta mais picante do mundo. Souza, P. T. 14 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 149516 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Biquinho; origem: Brasil; ardência: nenhuma; comprimento do fruto: 3 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 30 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC
---	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151666 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Bode; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 1 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 6 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 151665 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Brinco-de-princesa; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 1,5 cm; cor do fruto: amarelo quando maduro. Souza, P. T. 11 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
--	---

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149515 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Caiena; origem: Guiana Francesa; ardência: alta; comprimento do fruto: 14 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 28 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum baccatum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149512 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Cambuci; origem: Brasil; ardência: nenhuma; comprimento do fruto: 4,5 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 25 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
---	---

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149513 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Cascabel; Origem: México; ardência: média; comprimento do fruto: 4 cm; cor do fruto: vinho quando maduro. Souza, P. T. 26 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149511 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Culiacan; origem: desconhecida; ardência: média; comprimento do fruto: 17 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 24 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
---	---

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum baccatum</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151667 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Cumari ou Cumari verdadeira; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 1 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 10 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151663 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Pimenta-de-cheiro; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 2,5 cm; cor do fruto: vinho quando maduro. Souza, P. T. 8 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC
--	---

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149523 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Pimenta-de-cheiro-do-Pará; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 4 cm; cor do fruto: amarelo quando maduro. Souza, P. T. 13 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum baccatum</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151668 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: dedo-de-moça; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 8 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 12 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149518 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Guajillo; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 16 cm; cor do fruto: vinho quando maduro. Souza, P. T. 19 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149527 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Habanero laranja; origem: Caribe; ardência: alta; comprimento do fruto: 6 cm; cor do fruto: laranja quando maduro. Souza, P. T. 23 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149517 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Habanero mustard; origem: Caribe; ardência: alta; comprimento do fruto: 6 cm; cor do fruto: amarelo mostarda quando maduro. Souza, P. T. 20 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 151664 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Jalapeño; origem: México; ardência: média; comprimento do fruto: 10 cm; cor do fruto: vermelho com estrias quando maduro. Souza, P. T. 7 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
---	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum frutescens</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151670 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: malagueta; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 3 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 9 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149520 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Murupi da Amazônia gold; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 8 cm; cor do fruto: amarelo pálido quando maduro. Souza, P. T. 16 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
---	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149521 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Murupi golden; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 7 cm; cor do fruto: amarelo vivo quando maduro. Souza, P. T. 15 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149524 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Murupi laranja; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 6 cm; cor do fruto: laranja quando maduro. Souza, P. T. 18 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 61577 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Murupi verde; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 6 cm; cor do fruto: verde quando maduro. Souza, P. T. 2 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149519 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Murupi vermelha; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 7 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 17 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149526 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Peter pepper; origem: Estados Unidos; ardência: alta; comprimento do fruto: 9 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 22 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum frutescens</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 151669 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Pitanga; origem: Brasil; ardência: média; comprimento do fruto: 2,5 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 5 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC
---	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 53836 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Poblano; origem: México; ardência: suave; comprimento do fruto: 15 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 1 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum pubescens</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149525 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Rocoto; origem: Peru; ardência: alta; comprimento do fruto: 4 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 11 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
--	--

<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum chinense</i> Carvalho, S. I.C. 2 2010 58093 Brasil: São Paulo, Campinas, Joaquim Egídio, Via Profa. Lidia Abdala km 10 - Chácara Santa Edwiges, - alt. 852,25; lat. 22:50:33100 s; long. 46:53:16000 w. Popularmente conhecida como: Saco; origem: Brasil; ardência: alta; comprimento do fruto: 3,5 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 4 4/ 2/ 2010 Dupl.: UEC	<i>PLANTAS DO BRASIL</i> Herbário UEC  Solanaceae <i>Capsicum annuum</i> Vasconcelos, C. 1 2011 149510 Brasil: São Paulo, Salto, Estrada Velha Campinas – Capivari km 7 - Fazenda Ituaú-Terra de Gigantes - alt. 554; lat. 23:92:14 s; long. 47:21:117 w. Popularmente conhecida como: Serrano; origem: México; ardência: média; comprimento do fruto: 5 cm; cor do fruto: vermelho quando maduro. Souza, P. T. 29 13/ 1/ 2011 Dupl.: UEC
---	---

Anexo 2: Testes estatísticos

Teste Q

O teste Q é um teste estatístico utilizado para decidir se um resultado suspeito deve ser mantido ou rejeitado. Nesse teste, os resultados de um conjunto são ordenados em ordem crescente e o valor absoluto da diferença entre o resultado questionável X_q e seu vizinho mais próximo X_p é dividido pela faixa F (maior valor – menor valor) do conjunto inteiro para dar a grandeza Q, de acordo com a Equação 6 (SKOOG, 2011).

$$Q = \frac{|x_q - x_p|}{F}$$

Equação 6

Considera-se o intervalo de confiança desejado e o número de resultados do conjunto analisado para encontrar o valor de $Q_{\text{crítico}}$ tabelado. Se $Q_{\text{calculado}}$ for maior que $Q_{\text{crítico}}$, o resultado questionável pode ser rejeitado, com o grau de confiança indicado (SKOOG, 2011).

Teste F

O Teste F tem a finalidade de comparar a precisão dos resultados, utilizando-se a Equação 7 (SKOOG, 2011).

$$F = \frac{S_x^2}{S_y^2}$$

Equação 7

onde: S_x e S_y e são os valores de variância obtidos pelos dois métodos, sendo que, por convenção, o valor de variância maior é colocado no numerador.

Considera-se o intervalo de confiança desejado e os graus de liberdade para os conjuntos de resultados estudados, relacionados no numerador e denominador da Equação 7, para se encontrar o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado (SKOOG, 2011).

Se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$ os resultados não apresentam diferença estatística significativa com o grau de confiança considerado (SKOOG, 2011).

Teste t

O teste t é usado para determinar a significância da diferença entre a média experimental obtida a partir de um conjunto de medidas e o valor aceito como real através da Equação 8.

$$t = \left(\frac{\bar{X} - \mu}{s_d / \sqrt{N}} \right) \quad \text{Equação 8}$$

onde: $\bar{X}$ é a média dos resultados experimentais obtidos, μ é o valor aceito como real, N é o número de replicatas e s_d é o desvio padrão da população.

O desvio padrão da população é calculado utilizando-se a Equação 9.

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N}}{N - 1}} \quad \text{Equação 9}$$

Teste t pareado

O teste t pareado tem a finalidade de comparar a exatidão entre a média experimental com resultados de dois métodos diferentes, pela análise de seus pares de dados utilizando-se a Equação 10 (SKOOG, 2011).

$$t = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{d_i}{N}}{s_d / \sqrt{N}}$$

Equação 10

onde: d é a diferença entre os resultados obtidos por cada método, N é o número de replicatas dos métodos e s_d é o desvio padrão da diferença, que é calculado pela Equação 11.

O desvio padrão da diferença é calculado utilizando-se a Equação 11.

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N d_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N d_i)^2}{N}}{N - 1}}$$

Equação 11

Considera-se o intervalo de confiança desejado e o grau de liberdade é dado pelo número de determinações de cada método subtraído de 1 (N-1). Com esses dois parâmetros encontra-se o valor de t_{tabelado} (SKOOG, 2011).

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de t_{tabelado} , os resultados não apresentam diferença estatística significativa com o grau de confiança considerado (SKOOG, 2011).

Anexo 3: Método da variação contínua

O método da variação contínua é utilizado para determinar a proporção estequiométrica de complexos que absorvem na região visível do espectro.

Considerando o equilíbrio representado abaixo, onde P indica o íon central e X as espécies ligantes:



E, supondo que possam ser formados vários complexos:



O método da variação contínua permite identificar a estequiometria do complexo predominante (SIROKI *et al*, 1975).

O procedimento clássico envolve a mistura de alíquotas de soluções equimolares de P e de X, de forma que a concentração total de P+X permaneça constante. Por exemplo, uma solução estoque contendo $2,50 \times 10^{-3}$ mol/L de P e outra contendo $2,50 \times 10^{-3}$ mol/L de X podem ser misturadas fornecendo várias razões X:P, mas com uma concentração total constante de $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L. A absorbância de cada mistura é medida em um comprimento de onda com alta absorção e é construído um gráfico relacionando os valores de absorbância da mistura em função da fração molar de X. A absorbância máxima é atingida na composição correspondente à estequiometria do complexo predominante (SIROKI *et al*, 1975) e é indicada no gráfico como um ponto de máximo, correspondente no eixo x a uma fração molar do constituinte em questão.

Para o equilíbrio:



A absorbância máxima ocorre quando (fração molar de X) = $n/(n+1)$.

Para aplicar o método da variação contínua o complexo deve seguir a lei de Beer; deve-se utilizar força iônica e pH constantes, se for aplicável. Para conferir os resultados é importante fazer experimentos variando-se as concentrações totais de P+X, pois a absorbância máxima deverá ser observada na mesma fração molar (SIROKI *et al*, 1975).