

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

Luciene Mendonça da Costa

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO GÊNERO *CAPSICUM***

Chapecó-SC, dezembro, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

i

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO GÊNERO *CAPSICUM***

Luciene Mendonça da Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Comunitária Regional de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neusa Fernandes de Moura

Chapecó-SC, dezembro, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

583.952 Costa, Luciene Mendonça da
C837a Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do gênero
Capsicum / Luciene Mendonça da Costa. – Chapecó, 2007.

78 p.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Comunitária
Regional de Chapecó, 2007.
Orientadora: Profª. Neusa Fernandes de Moura

I. Pimenta (Capsicum) - Avaliação. I. Moura, Neusa Fernandes de.
II. Título

CDD 583.952

Catálogo elaborado por Daniele Lopes CRB 14/989



UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA
DO GÊNERO *CAPSICUM*

Luciene Mendonça da Costa

Esta dissertação foi julgada adequadamente para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Ambientais
sendo aprovada em sua forma final.

Prof^ª. Dra. Neusa Fernandes de Moura
Orientadora

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Alessandra Machado

Prof^ª. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues

Chapecó, 03 de dezembro de 2007

DEDICATÓRIA

“A Deus, pela vida e força para recomeçar após todas as tempestades. Aos meus pais Gelson e Sandra, pela educação, apoio, amor e dedicação. Ao meu amado Alexandre, pela enorme paciência, orientação e amor.”

AGRADECIMENTO

À Universidade Comunitária Regional de Chapecó (UNOCHAPECÓ), pela bolsa de incentivo a pesquisa e apoio institucional necessário para a realização deste trabalho.

A professora Rosiléa Garcia França, Coordenadora do Mestrado em Ciências Ambientais, pelo apoio e comprometimento com a qualidade do ensino.

A professora Neusa Fernandes de Moura, pela orientação, dedicação, paciência e amizade.

Aos alunos do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais, especialmente a Naira, Carol, Karina, Vanessa, Katiuska, Melodi e Carlinhos, pela valiosa ajuda na condução dos experimentos e pela amizade.

A professora Aurora Ribeiro de Goicochea, Departamento de Economia Doméstica da Universidade Federal de Viçosa/MG, pelos conhecimentos adquiridos durante a Iniciação Científica no Grupo de Programa Especial de Treinamento.

Ao professor Benjamin Gonçalves Milagres, Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa/MG, pelo apoio a pesquisa.

Ao Dr. Alexandre de Oliveira Teixeira pela orientação na elaboração da dissertação.

Aos meus pais, Gelson Marques da Costa e Sandra Mendonça da Costa, a minha irmã, Lidiane Mendonça da Costa, pelo apoio e incentivo durante o mestrado.

As amigas do CETEC, Cynthia, Fábria e Mariane, pelo apoio, amizade e paciência nos meus momentos de estresse.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

COSTA, Luciene Mendonça da. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do gênero *Capsicum*. (Mestrado). Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2007. 78p.

Avaliou-se a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto (EB) e frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e acetato de etila (FA) das pimentas malagueta (*C. frutescens*), cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*), cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) e pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*). O EB foi obtido por extração líquido-líquido em solução hidro-alcoólica (etanol 96°GL) seguida de fracionamento pelo sistema de solventes com grau de polaridade crescente, resultando em FH, FC e FA. Determinou-se a concentração de capsaicinóides e fenólicos totais por espectrofotometria. A atividade antioxidante foi avaliada pelo Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico, ensaio do radical DPPH[•] -2,2-difenil-1-picrilhidrazila e pela quantificação de substâncias reativas ao ácido 2-Tiobarbitúrico – TBARS em almôndegas pré-cozidas. Avaliou-se a atividade antimicrobiana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM). As FC e FA apresentaram maior concentração de fenólicos totais e capsaicinóides. A pimenta cumari foi a espécie com maior concentração destes compostos. A melhor atividade antioxidante pelo Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico, foram obtidos pelo EB e FA da pimenta cambuci, seguido do EB da pimenta malagueta. Pelo método DPPH a FC e FA apresentaram menores valores de EC₅₀, sendo a pimenta cumari e cambuci as mais efetivas. Pela metodologia do TBARS, o melhor desempenho foi obtido pela FH da malagueta, seguida pela FC da cambuci. A pimenta cumari apresentou para a FA e FC uma CIM de 1,25 mg/ml e CLM 1,5 mg/ml para a *L. monocytogenes*. A pimenta cambuci foi a segunda mais efetiva com atividade bactericida frente a *S. typhimurium*, *C. perfringens* e *L. monocytogenes*, sendo que a FA a mais efetiva, com CIM e CLM de 5 mg/ml frente a *S. typhimurium*. A FH da pimenta malagueta apresentou atividade bacteriostática frente a *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *C. perfringens* com CLM de 5 mg/ml. O pimentão obteve apenas atividade bacteriostática frente a seis bactérias. Estes resultados demonstram que a pimenta cumari, cambuci e malagueta podem ser utilizadas como agentes antioxidantes e conservantes em alimentos, apresentando-se como alternativa natural na garantia da qualidade do produto final.

Palavras-chave: *Capsicum*, antimicrobiano e antioxidante.

ABSTRACT

COSTA, Luciene Mendonça da. Assessment of Antioxidant and antimicrobial activity of the genus *Capsicum*. (Master's). Universidade Comunitária Regional de Chapecó, 2007. 78p.

The antioxidant and antimicrobial activity were evaluated to the crude extract (EB) and hexane (FH), chloroform (FC), and ethyl acetate (FA) fractions, from the malagueta pepper (*C. frutescens*), cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*), cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) and magali pepper (*C. annum* var. *annuum*). The EB was obtained by extraction hydro-alcoholic, followed by fractioning with solvent system with increasing polarity degree, resulting in FH, FC and FA. Capsaicoids and total phenolics were determined by spectrophotometry. Antioxidant activity was evaluated by the system β -Carotene/Linoleic Acid, radical DPPH \cdot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay and by quantification of substances reactive to the acid 2-Thiobarbituric (TBARS) in precooked meat balls. Antimicrobial activities were obtained by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC). The FC and FA showed higher concentration of total phenolics and capsaicinoids. Cumari pepper had the highest concentration of these compounds. The better antioxidant activity by the β -Carotene/Linoleic Acid System was obtained to cambuci pepper's EB and FA, followed by malagueta's EB. The DPPH method, the FC and FA presented the lowest EC₅₀ values, with cumari and cambuci peppers being the most effective. The TBARS methodology, the better performance was obtained by malagueta's FH, followed by cambuci's FC. The FA and FC from Cumari pepper showed MIC of 1.25 mg/ml and MLC of 1.5 mg/ml for *L. monocytogenes*. Cambuci pepper was the second most effective with bactericidal activity against *S. typhimurium*, *C. perfringens* and *L. monocytogenes*, the FA being the most effective, with MIC and MLC of 5 mg/ml against *S. typhimurium*. The FH from Malagueta pepper's showed bacteriostatic activity against *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* and *C. perfringens* with MLC of 5 mg/ml. Magali pepper had bacteriostatic activity against six bacteria. The results show that cumari, cambuci and malagueta peppers can be used as antioxidant agents and preservatives in food, being natural alternatives to guarantee final product quality.

Keywords: *Capsicum*, antimicrobial and antioxidant activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> “pimentão”	5
Figura 2 – <i>C. frutescens</i> “malagueta”	6
Figura 3 – <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> “cambuci ou chapéu de frade”	6
Figura 4 – <i>C. chinense</i> “pimenta de bode”	7
Figura 5 – <i>C. pubescens</i> “locato”	7
Figura 6 - Estrutura da capsaicina	8
Figura 7 - Estrutura da dihidrocapsaicina	8
Figura 8 – Biossíntese da capsaicina a partir da vanililamina.....	8
Figura 9 – Estrutura da Vitamina A	10
Figura 10 – Estrutura do Vitamina C	10
Figura 11 – Estrutura do β -Caroteno	11
Figura 12 - Estrutura química da capsantina	11
Figura 13 - Estrutura do capsorubina	11
Figura 14 - Estrutura do β -criptoxantina	11
Figura 15 – Estrutura da Zeaxantina	11
Figura 16 – Estrutura de alguns carotenóides	16
Figura 17 – Estrutura do tocoferol	17
Figura 18 – Parede celular de uma bactéria Gram positiva	21
Figura 19 - Parede celular de uma bactéria Gram negativa	21
Figura 20 - Pimentas malagueta (<i>C. frutescens</i>), pimentão magali (<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>), pimenta cambuci (<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>) e pimenta cumari (<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	30
Figura 21 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos brutos e frações dos frutos c/sementes de espécies de pimentas e pimentão	31
Figura 22 - Placa de cultura de células para identificação do CIM e CLM dos extratos e frações testados, com 96 poços de fundo chato, identificação alfa-numérica e esterilizadas com raios gama	40
Figura 23 - Concentração de capsaicinóides (mg/100g de extrato) em função do tipo extrato e pimenta <i>Capsicum</i>	43
Figura 24 - Concentração de Fenólicos Totais expressos como miligrama de equivalente de catecol por 100g de extrato, em função do tipo de extrato e pimenta <i>Capsicum</i>	46
Figura 25 - Atividade antioxidante (%) do extrato bruto e fracionado de pimentas <i>Capsicum</i> , pelo sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico	48
Figura 26 - Atividade antioxidante (EC_{50}) do extrato bruto e fracionado de pimentas <i>Capsicum</i> , pelo método DPPH	54
Figura 27 - Número de substâncias reativas ao ácido 2-Tiobarbitúrio (mg de malonaldeído por Kg de almôndegas), em função do extrato bruto e fracionado de pimentas <i>Capsicum</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de capsaicinóides encontrados em genótipos de pimentas da coleção Embrapa Hortaliças (1999)	9
Tabela 2 – Formulação das almôndegas	36
Tabela 3 – Rendimento da extração e fracionamento das pimentas <i>Capsicum</i> com solventes orgânicos	41
Tabela 4 - Concentração de Capsaicinóides (mg/100g) de extrato bruto e fracionado de pimentas <i>Capsicum</i>	42
Tabela 5 - Concentração de Fenólicos Totais (mg/100g) de extrato bruto e fracionado de pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	45
Tabela 6 - Atividades antioxidantes (%) dos extratos bruto e fracionados de pimentas <i>Capsicum</i> e BHT, pelo Sistema β -Caroteno/Ácido linoleio	47
Tabela 7 - Atividades antioxidantes (%) obtidos em diversas concentrações dos extratos bruto e fracionados das pimentas <i>Capsicum</i> e BHT, pelo método DPPH	52
Tabela 8 – Composição química das almôndegas condimentadas com extratos e frações de pimentas <i>Capsicum</i>	55
Tabela 9 - Quantificação de substâncias reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico, em almôndegas condimentadas com extratos bruto e fracionados de pimentas do gênero <i>Capsicum</i> e BHT....	56
Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) em mg/ml, de extrato bruto e fracionado da pimenta <i>C. baccatum</i> vr. <i>prateatermissum</i>	62
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado da pimenta <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (cambuci).....	62
Tabela 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado da pimenta <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (pimentão magali).....	63
Tabela 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado da pimenta <i>C. furtescens</i> (malagueta)	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SHU	-----	Scoville Heat Units
UV	-----	Ultra Violeta
JECFA	-----	Joint Committee on Food Aditives
FAO	-----	Food and Agriculture Organization
WHO	-----	World Health Organization
IDA	-----	Ingestão iária Aceitável
BHT	-----	Butil Hidroxitolueno
DPPH	-----	2,2-difenil-1-picirilhidrazila
CE ₅₀	-----	Concentração Eficiente
CI ₅₀	-----	Concentração Inibitória
TBA	-----	Ácido 2-Tiobarbitúrico
DTA's	-----	Doenças Transmitidas por Alimentos
MDR's	-----	Bombas de Composto Multidrogas
CIM	-----	Concentração Inibitória Mínima
CLM	-----	Concentração Letal Mínima
IINB	-----	Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana
IINAB	-----	Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana
UFC	-----	Unidades Formadoras de Colônias
EB	-----	Extrato Bruto
FH	-----	Fração Hexânica
FC	-----	Fração Clorofórmica
FA	-----	Fração Acetato de Etila
ASA	-----	Amostra Seca ao Ar
ASE	-----	Amostra Seca em Estufa
CLAE	-----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
BHA	-----	Butil-hidroxi-anisol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Histórico.....	3
2.2. Gênero Capsicum.....	4
2.3. Composição Química.....	8
2.4. Atividade Antioxidante.....	11
2.4.1. Oxidação lipídica.....	11
2.4.2. Antioxidantes.....	13
2.4.3. Métodos para avaliação da atividade antioxidante.....	17
2.5. Atividade Antimicrobiana.....	18
2.5.1. Bactérias causadoras de doenças de origem alimentar.....	20
2.5.2. Antimicrobianos.....	24
2.5.3. Método CIM e CLM.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Coleta do material.....	30
3.2. Extração e Fracionamento com Solventes Orgânicos.....	31
3.3. Determinação do rendimento da extração e fracionamento das pimentas Capsicum com solventes orgânicos.....	32
3.4. Determinação de Capsaicinóides.....	32
3.5. Determinação de Fenólicos Totais.....	33
3.6. Análise da Atividade Antioxidante in vitro.....	34
3.6.1. Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico.....	34
3.6.2. Determinação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	35
3.7. Análise antioxidante pela determinação do número de TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico em Almôndegas assadas.....	36
3.7.1. Ingredientes para formulação das almôndegas.....	36
3.7.2. Preparação das almôndegas.....	36
3.7.3. Análise Química.....	37
3.7.4. Determinação do número de TBARS.....	37
3.8. Atividade Antimicrobiana.....	38
3.8.1. Microrganismos.....	38
3.8.2. Preparação dos Inóculos Bacterianos.....	39
3.8.3. Avaliação da atividade antibacteriana.....	39
4.1. Rendimento da Extração e Fracionamento das Pimentas Capsicum com Solventes Orgânicos.....	41
4.2. Quantificação de Capsaicinóides.....	41
4.3. Fenólicos Totais.....	44
4.4. Atividade Antioxidante.....	47
4.4.1. Sistema β Caroteno Ácido Linoleico.....	47
4.4.2. DPPH.....	51
4.4.3. Análise Química das Almôndegas.....	54
4.4.4. Determinação do Número de TBARS.....	55
4.5. Atividade Antimicrobiana.....	60
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

O alimento, independente da cultura e da época vivida pelo homem, é um fator essencial para manutenção da saúde humana (MOURA et al., 2002), pois se relaciona com a nutrição, sobrevivência, desempenho na vida, conservação da espécie e longevidade (ARAÚJO, 2001). Desta forma todo cidadão possui o direito de acesso a alimentos seguros, de forma a garantir o seu bem estar e melhoria na qualidade de vida.

Naturalmente os alimentos estão em constantes modificações, representada por alterações químicas, físicas, enzimáticas e microbiológicas, que provocam a deterioração dos alimentos, principalmente devido à contaminação microbiológica e alterações oxidativas de lipídios e outros nutrientes que são susceptíveis à ação do oxigênio e radicais livres.

A indústria de alimentos tem como uma das suas grandes preocupações a segurança alimentar, devido às exigências dos consumidores com a qualidade higiênico-sanitária e nutricional dos alimentos. Neste contexto, há grande interesse em encontrar conservantes naturais, como as plantas condimentares, para a utilização em produtos alimentícios, objetivando substituir ou minimizar o uso de aditivos sintéticos, tão questionados quanto aos possíveis efeitos negativos a saúde. Reforçando a tendência ao uso de produtos orgânicos, produzidos sem danos ao meio ambiente e a saúde humana.

Plantas condimentares, tais como as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum*, que sempre foram usadas pelos índios e civilizações antigas para tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar, além de serem utilizadas como conservantes em alimentos (REIFSCHNEIDER, 2000). Porém, pesquisas apresentam resultados que ainda não comprovaram efetivamente a atividade antimicrobiana e antioxidante desse condimento. Isso porque, segundo Melo (2005), o amplo estudo de plantas apresenta uma característica comum, seu elevado conteúdo em substâncias ou princípios ativos, com propriedades químicas, bioquímicas ou organolépticas muito específicas.

As concentrações dos compostos que possuem ação antibacteriana e antioxidante podem variar em função de vários fatores. Segundo Huyghebaert (2003), o tipo de planta, local de origem, método de extração além das condições climáticas durante o crescimento da planta, interferem na produção e ação dos princípios ativos. Também, os fatores como desenvolvimento e sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutriente e poluição podem influenciar no conteúdo de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2006).

Dessa forma, é importante que estudos das pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum* sejam aprofundados no intuito de se conhecerem melhor sua atividade biológica e, possivelmente, serem utilizados na conservação de alimentos. O processamento dos alimentos deve ter como objetivo a segurança alimentar, visando não só a qualidade estética, nutricional, gustativa, higiênica e sanitária, mas principalmente a redução das reações de oxidação e inativação efetiva de patógenos ou a inibição de sua proliferação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, das pimentas malagueta (*C. frutescens*), cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*), cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) e pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

As pimentas do gênero *Capsicum* são mencionadas na Bíblia, desde a época em que os gregos e os romanos pagavam altos preços por elas. Alaric, rei dos Visigotos, que ameaçou saquear Roma, ordenou que junto com outras riquezas, Roma deveria entregar-lhe 1.500 Kg de pimenta (BORGET, 1993).

Os navegadores de Portugal e da Espanha que descobriram o novo mundo também fizeram a descoberta de muitas plantas que hoje são cultivadas mundialmente, entre elas às pimentas e pimentões, que já eram utilizadas pelos nativos. Cinco séculos depois do descobrimento das Américas, as pimentas passaram a dominar o comércio das especiarias pungentes, tanto nos países tropicais quanto nos de clima temperado (REIFSCHNEIDER, 2000).

Os espanhóis deram às pimentas os nomes de “pimento” ou “pimientos”, talvez pelo sabor picante e por se assemelharem ao da pimenta da Índia que eles também procuravam no Ocidente. Os “pimentos” foram difundidos até na Índia pelos portugueses, utilizados como alternativa à pimenta de outras espécies, por serem produzidas com preços mais baixos, passando a serem consumidas pelos pobres, sendo chamada de “pimenta dos pobres”, conquistando com o tempo muita importância no contexto geral das especiarias (FERRÃO, 1993).

As pimentas e pimentões podem ser considerados como os primeiros aditivos alimentares utilizados pelos povos antigos do México e da América do Sul. Eram usadas regularmente pelos ameríndios para tornar mais atraentes a ingestão de carnes e cereais, além de serem utilizados para preservar os alimentos da contaminação por bactérias e fungos patogênicos, contribuindo para a saúde, longevidade e a manutenção da capacidade reprodutiva destas civilizações. Seu emprego tornou-se característico da culinária da América Tropical. As pimentas são estimulantes do apetite e auxiliares da digestão. Sua ingestão aumenta a salivação e estimula a secreção gástrica e a mobilidade, dando uma sensação de bem estar após a ingestão (REIFSCHNEIDER, 2000).

O Brasil é o segundo maior produtor de pimenta no mundo (RISTORI et al., 2002) e centro da diversidade do gênero *Capsicum* (REIFSCHNEIDER, 2000).

Essa hortaliça está difundida em todas as regiões do Brasil, sendo que as principais áreas de cultivo são as regiões sudeste e centro oeste. O mercado é bastante diversificado,

sendo comercializadas para o consumo *in natura*, conservas caseiras e exportação do produto industrializado (WAGNER, 2003).

O gênero *Capsicum* é rico em vitamina C, complexo B, vitamina A, vitamina E, β -caroteno e β -criptoxantina. As pimentas doces são usadas como corantes naturais, na forma de extratos concentrados (oleoresinas) e de pó (colorau ou páprica) (CARVALHO & BIACHETTI, 2004).

2.2. Gênero *Capsicum*

As espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (do grego Kipto, que significa morder, picar), pertencem à família *Solanacea* (REIFSCHNEIDER, 2000).

Divisão: *Spermatophyta*

Filo: *Angiospermae*

Classe: Dicotiledônea

Ramo: Malvales-Tubiflorae

Ordem: *Solanales (Personatae)*

Família: *Solanacea*

Gênero: *Capsicum* (WAGNER, 2003).

O gênero *Capsicum* apresenta grande variação morfológica, com frutos de tamanhos, formatos, cores e pungências (característica exclusiva do gênero *Capsicum*, sendo atribuída a uma amida chamada capsaicina) variadas. A coloração do fruto maduro é geralmente vermelha, podendo variar desde amarelo-leitoso ao roxo ou preto. O formato varia com as espécies, existindo frutos alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, quadrados, campanulados. Por observação de determinadas características e usos, são separados e classificados vulgarmente de pimentas e pimentões. Assim, os pimentões apresentam frutos grandes e largos (10-21 cm de comprimento x 6-12 cm de largura), formato quadrado a cônico, paladar não pungente (doce). As pimentas apresentam, em sua maioria, frutos menores que os pimentões, formatos variados e paladar predominantemente pungente (CARVALHO & BIACHETTI, 2004).

As pimentas e pimentões são espécies autógamas, ou seja, possuem órgãos reprodutor feminino e masculino em uma mesma flor, isso significa que na natureza não há troca de genes entre indivíduos tanto da mesma espécie ou entre espécies do gênero *Capsicum*. Assim a polinização cruzada só é facilitada tanto por modificações morfológicas da flor com estiletes bastante extensos, pela ação de insetos polinizadores, ou com ação do

homem com a polinização manual (REIFSCHNEIDER, 2000).

Das 26 espécies de pimentas classificadas apenas cinco são comercializadas e domesticadas: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (CARVALHO & BIACHETTI, 2004).

O *C. annuum* var. *annuum* (Figura 1) é a espécie mais cultivada, apresentando maior variabilidade genética, umas com frutos doces, outras frutos mais ou menos picantes. Cultivada em maior escala no México e América Central, centros secundários existem no sudeste e no centro da Europa, África, Ásia e América Latina (FERRÃO, 1993; REIFSCHNEIDER, 2000).



Figura 1 - *C. annuum* var. *annuum* “pimentão”

O *C. frutescens* (Figura 2) é uma espécie que se caracteriza por frutos extremamente pungentes ou picantes. Produzem frutos geralmente pequenos, eréctos ou pendentes, verdes ou amarelados quando em crescimento e vermelhos com a maturação (FERRÃO, 1993). Originária da América do Sul, onde achados arqueológicos no Peru comprovam sua existência no ano de 1200 a.C. (PICKERSGILL, 1969). Distribuem-se pelo sudeste brasileiro até a América Central e as Índias Ocidentais (REIFSCHNEIDER, 2000).



Figura 2 - *C. frutescens* “malagueta”

A espécie *C. baccatum* var. *pendulum* (Figura 3) apresenta uma considerável diversidade, já as variedades *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *praetermissum* são frequentemente encontradas sob cultivo, e ocasionalmente, como espontânea. A primeira é amplamente distribuída geograficamente, enquanto segunda espécie é endêmica do Brasil, ou seja, uma variedade exclusiva do Brasil (REIFSCHNEIDER, 2000). Diferenciam-se morfologicamente entre si pela cor das flores: a *C. baccatum* var. *baccatum* tem flores brancas com duas manchas esverdeadas na base, já o *C. baccatum* var. *praetermissum* apresenta flor branca com uma faixa lilás-violeta na margem das pétalas. O *C. baccatum* é originária da americana, provavelmente da Bolívia (FERRÃO, 1993).



Figura 3 - *C. baccatum* var. *pendulum* “cambuci ou chapéu de frade”

O *Capsicum chinense* (Figura 4) é a pimenta mais cultivada no leste dos Andes. A espécie mais brasileira de todas as espécies, pois foram domesticadas pelos indígenas amazônicos, sendo assim a área de maior diversidade desta espécie (REIFSCHNEIDER, 2000). Com características morfológicas muito parecidas a da espécie *C. frutescens*, apresentando maior diferenciação nos pedicelos e nas flores (FERRÃO, 1993).



Figura 4 - *C. chinense* “pimenta de bode”

A espécie *C. pubescens* (Figura 5) vem das terras altas, relativamente resistentes ao frio, tendo sua origem na Bolívia. Não estando representada no Brasil (REIFSCHNEIDER, 2000). Esta espécie distingue-se claramente das demais devido aos seus órgãos aéreos serem pubescentes, com flores azuis ou púrpuras, enquanto que nas outras espécies são brancas ou branco-esverdeadas (FERRÃO, 1993).



Figura 5 – *C. pubescens* “locato”

2.3. Composição Química

A pungência ou picância das pimentas deve-se a presença de amidas chamadas capsaicinóides, ocorrendo em maior quantidade a capsaicina (Figura 6) e dihidrocapsaicina (Figura 7). Tais compostos são encontradas na placenta dos frutos (BOSLAND, 1993; REIFSCHNEIDER, 2000; SALAZAR-OLIVO & SILVA-ORTEGA, 2004).

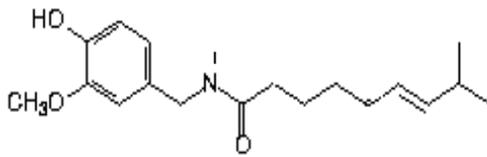


Figura 6 - Estrutura da capsaicina

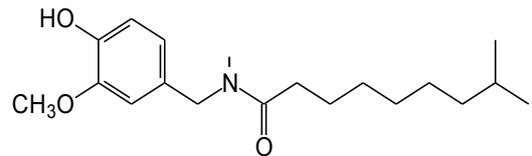


Figura 7 - Estrutura da dihidrocapsaicina

Os capsaicinóides são sintetizados pela via metabólica dos fenilpropanóides, originados da vanililamina e um derivado da AcetilCoA (Figura 8) (WINK, 1997).

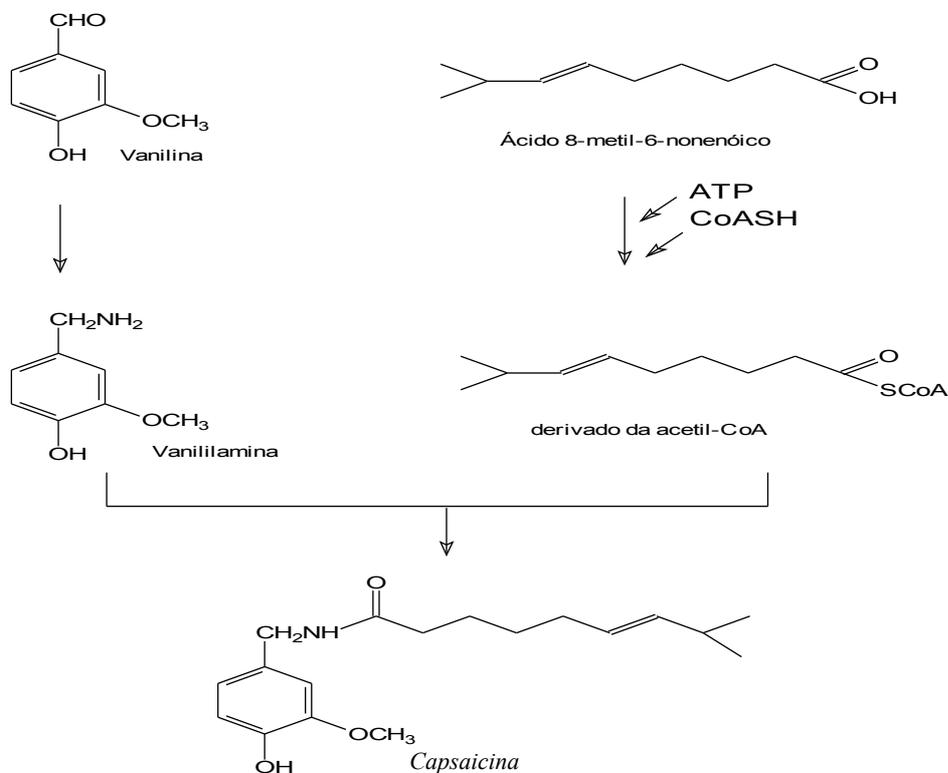


Figura 8 – Biossíntese da capsaicina a partir da vanililamina

O teor dos capsaicinóides nas pimentas e pimentões é avaliado pela escala de

Unidade de Calor Scoville (Scoville Heat Units–SHU), que expressa a quantidade de pungência, com valores de zero para as pimentas doces a 300.000 SHU ou mais para pimentas picantes (Tabela 1) (REIFSCHNEIDER, 2000). Segundo Bosland (1993) a concentração de uma parte por milhão (ppm) de capsaicinóides corresponde a 15 SHU.

Tabela 1 - Teor de capsaicinóides encontrado em genótipos de pimenta da coleção da Embrapa Hortaliças (1999)

Genótipo/Picância	Capsaicinóides totais (SHU)	Capsaicinóides %
Doce (não picante)		
Pimenta “cambuci” (<i>C. Baccatum</i>)	0	0
Pimentão cv. Apolo (<i>C. annuum</i>)	0	0
Baixa		
Pimenta “panca” Peru (<i>C. chinense</i>)	8.690	0,05
Pimenta redonda vermelha (<i>C. baccatum</i>)	10.510	0,06
Média		
Pimenta “jalapeno” (<i>C. annum</i>)	34.590	0,20
“Pimenta-de-cheiro” (<i>C. chinense</i>)	47.180	0,27
Alta		
Pimenta alongada vermelha (<i>C. baccatum</i>)	81.600	0,48
“Pimenta-de-bode” (<i>C. chinense</i>)	105.500	0,59
Muito Alta		
Pimenta “malagueta” (<i>C. frutescens</i>)	156.730	0,89
“Pimenta-de-passarinho” (<i>C. chinense</i>)	219.020	1,22

Adaptado de REIFSCHNEIDER (2000)

Algumas pesquisas mostram que pimentas cultivadas na primavera-verão são mais pungentes que as do outono-inverno. Tal fenômeno ocorre devido ao estresse, que influencia a via dos fenilpropanóides e afeta indiretamente a síntese de capsaicinóides (KIRSCHBAUM-TITZE et al. 2002).

Siqueira et al. (1988), encontram em suas pesquisas sobre *Capsicum annuum* o teor de 0,174% de capsaicina, para frutos frescos em fase de maturação. Acrescenta que os valores encontrados de capsaicinóides em *Capsicum sp.* tem sido muito variável, principalmente se forem considerados os diferentes métodos de extração e de avaliação aplicados.

Pineda-Cisneros et al. (2006), quantificaram por meio da cromatografia de gasosa, o teor de capsaicina e dihidrocapsaicina em sete cultivares de pimenta *Capsicum*. Especificamente o índice de capsaicina foi maior para as pimentas *C. chinenses* seguida da *C. annuum* var. *annuum* e *C. annuum* var. *aviculare*, enquanto que os índices de dihidrocapsaicina foram maiores para *C. annuum* var. *annuum*, seguida *C. chinene* e *C.*

annuum var. *aviculare*.

A ardência, a inflamação, a dessensibilização, e o estímulo elétrico de nervos sensoriais provocada pelos capsaicinóides, ocorrem devido ao bloqueio de um neurotransmissor chamado substância “P”, necessário para a excitação dos receptores da dor (JANCSO et al., 1967; BOSLAND, 1993; PURKISS et al., 2000) e que desencadeiam diversos processos fisiológicos. Um deles é a liberação de endorfinas, que provocam uma sensação de bem estar, provável razão pelo seu grande consumo (WAGNER, 2003).

Os compostos fenólicos como os capsaicinóides, componente ativo do gênero *Capsicum*, estimulam enzimas pancreáticas e intestinais em animais não ruminantes, reduzindo a viscosidade intestinal e melhorando a passagem dos nutrientes através do intestino para os principais locais de absorção (MILTENBURG & BRUGALLI, 2004).

Foi verificado que uso continuado de pimentas picantes por grupos étnicos da Tailândia e da África, levou a diminuição do teor de fibrina no sangue, componente responsável pela formação do trombo, elevando conseqüentemente a uma baixa incidência de tromboembolismo (REIFSCHNEIDER, 2000).

As pimentas são excelentes fontes de vitaminas A (Figura 9) e C (Figura 10), bem como de compostos fenólicos, que são antioxidantes importantes para sobrevivência da planta. São ricas também em carotenóides como β -caroteno (Figura 11), capsantina (Figura 12), capsorubina (Figura 13) e β -cripitoxantina (Figura 14) (MARKUS et al 1999).

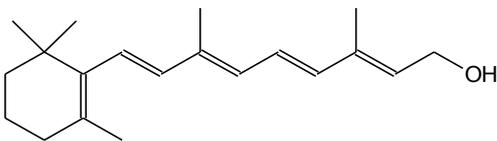


Figura 9 – Estrutura da Vitamina A

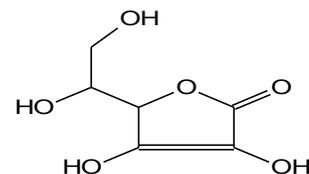


Figura 10 – Estrutura da Vitamina C

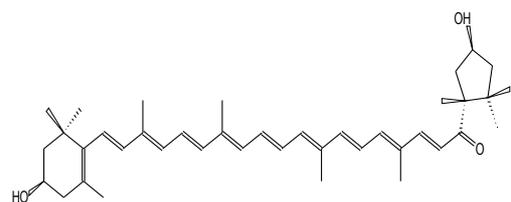
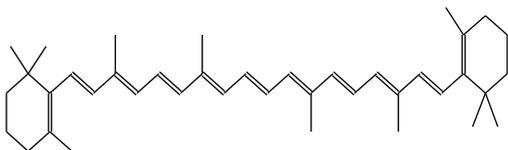


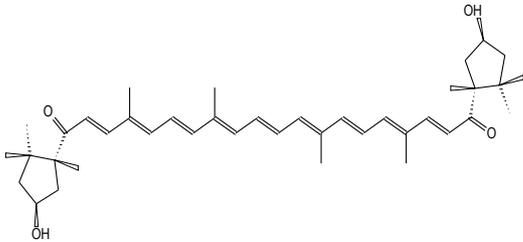
Figura 11 – Estrutura do β - caroteno

Figura 12 - Estrutura da capsantina

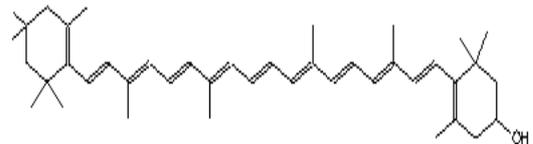


Figura 13 - Estrutura da capsorubina

Figura 14 – Estrutura do β -cripitoxantina

Segundo Howord et al. (2000), a concentração de carotenóides como β -cripitoxantina, α -caroteno, β -aroteno, capsantina e zeaxantina (Figura 15), aumentou com a maturação dos frutos em função da mudança de cor, para espécies de *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinenses*. O ácido ascórbico também aumentou em função da maturação destas espécies testadas. Porém a concentração de flavonóides que variou muito de uma espécie para outra, diminuiu com a maturação.

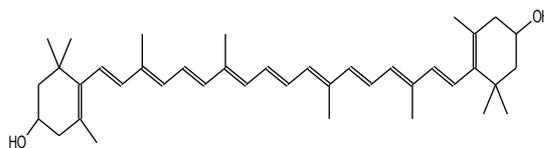


Figura 15 – Estrutura da zeaxantina

2.4. Atividade Antioxidante

2.4.1. Oxidação lipídica

A deterioração dos alimentos pela oxidação de lipídios é preocupação constante para indústria de alimentos, tanto quanto a contaminação microbiológica, pois se apresenta como fator principal para qualidade e tempo de vida do alimento.

Os lipídios constituem excelente fonte energética e importante veículo de vitaminas lipossolúveis. São altamente instáveis e susceptíveis a várias mudanças em suas propriedades organolépticas, funcionais e valor nutricional (GUERRA & LAJOLO, 2005).

A maioria (90%) dos lipídios é encontrada na forma de triacilgliceróis, mas também se apresentam na forma de fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios, lipoproteínas, etc... A oxidação é a principal causa da deterioração dos lipídios, podendo ocorrer de várias formas como pela autooxidação, hidrólise, absorção de sabores e odores estranhos (ARAÚJO, 2001).

As reações de oxidação das gorduras e óleos ocorrem quando o oxigênio reage com lipídios em uma série de reações em cadeia de radicais livres, sendo freqüentemente iniciada pela exposição dos lipídios à luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos, ou catálise metalo-proteica, provocando complexas alterações químicas (ATOUI et. al. 2005).

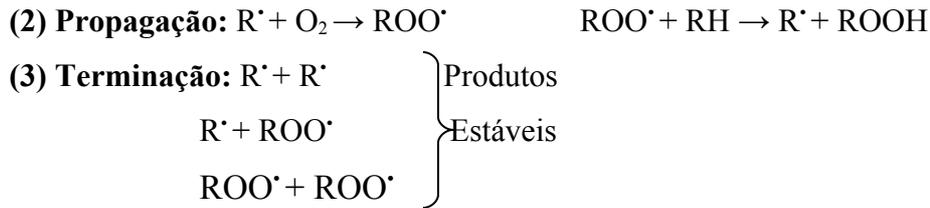
Conforme Silva et al. (1999), a oxidação lipídica pode acontecer por várias vias, como a fotoxidação, oxidação enzimática e autooxidação. A fotoxidação dos lipídios ocorre pela radiação UV em presença de sensibilizadores como a clorofila e a mioglobina, envolvendo a formação do oxigênio singleto (1O_2), como intermediário reativo.

O oxigênio tripleto é um di-radical com dois elétrons paralelos separados em orbitais, com ligações interatômicas fracas, correspondendo a 21% do ar. O oxigênio singleto que é produzido na atmosfera ou diretamente no alimento, tem capacidade de provocar a desidrogenação de compostos orgânicos, reagindo diretamente nas ligações insaturadas, formando peróxidos. É uma espécie altamente eletrofílica, pois seus dois elétrons possuem rotação oposta, provocando uma grande força de repulsão eletrostática (ARAÚJO, 2001).

Oxidação enzimática ocorre pela ação de lipoxigenases, que catalisam a adição de oxigênio a cadeia carbônica dos lipídios poli-insaturados, formando peróxidos e hidroperóxidos (HALLIWELL et al. 1995).

O mecanismo da autooxidação dos lipídios ocorre nas etapas de iniciação (1), propagação (2) e terminação (3) conforme esquema abaixo: Iniciação – com a exposição à luz e calor, os ácidos graxos se transformam em radicais livres devido a retirada de um hidrogênio do carbono alílico; Propagação – os radicais livres são transformados em peróxidos e hidroperóxidos, por serem susceptíveis ao oxigênio atmosférico, propagando a reação em cadeia; Terminação – onde os radicais livres são eliminados do sistema reagindo entre si pela ausência de oxigênio (GOMÉZ, 2003).





Onde: RH: ácido graxo insaturado; R^{\bullet} - Radical livre; ROO^{\bullet} - Radical peróxido e $ROOH$ – Hidroperóxido.

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula, apresentando meia vida curta (RENZ, 2003).

Os radicais livres derivados do oxigênio incluem os radicais superóxido (O_2^{\bullet}), hidroxil (OH^{\bullet}), hidroperoxil (HOO^{\bullet}), peroxil (ROO^{\bullet}) e alkoxil (RO^{\bullet}). Outras espécies reativas comuns do oxigênio (ROS) produzidas no corpo humano incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Radicais livres atacam moléculas estáveis e seqüestram seus elétrons, a molécula que perdeu seu elétron torna-se ela mesma um radical livre, iniciando assim a reação em cadeia (GOMÉZ, 2003).

A oxidação de lipídios em alimentos causa perda na qualidade, pois os radicais livres atacam ligações insaturadas de moléculas lipídicas, proteínas, carboidratos, e nucleotídeos, causando o desenvolvimento de rancidez, off-flavors, perda nutricional e diminuição da vida de prateleira dos produtos (LOULI et al., 2004). Nos seres humanos os radicais livres podem causar diversas doenças como câncer, osteoclerose e processo de envelhecimento.

Os processos oxidativos podem ser evitados através de modificações das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidante com a propriedade de impedir ou diminuir as reações oxidativas (SOARES, 2002).

2.4.2. Antioxidantes

Os antioxidantes têm a função de retardar o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, ocasionados pela oxidação de ácidos graxos insaturados como triacilgliceróis e/ou lipídeos polares. Hoje em dia há uma tendência geral no processamento de alimentos, de substituir os antioxidantes sintéticos pelos inibidores da oxidação ou pelo uso preferencial de ingredientes que naturalmente possuem atividade antioxidante (CINTRA & MANCINI FILHO, 2001; GOMÉZ, 2003; SHYMALA et al., 2005).

O antioxidante para ser utilizado em alimentos, além de ser efetivo em baixas concentrações (0,01% ou menos), deve ser compatível com o substrato, não acrescentar odor ou sabor estranho ao alimento, ser efetivo durante o período de armazenamento do produto, termicamente estável e de fácil incorporação ao alimento (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio da inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação, e através da eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeias (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SOARES, 2002).

Ao doarem seus elétrons os compostos antioxidantes não se transformam em radical livre, pois são estáveis em qualquer forma, por isso são definidos como substâncias capazes de quelar ou estabilizar radicais livres (KAUR & KAPOOR, 2001; ATOUI et al., 2005).

Os radicais livres impedem a formação dos radicais livres, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. São capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando as lesões e recuperando as membranas celulares e moléculas do DNA (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O retardo na oxidação lipídica é conseguido pela utilização de antioxidantes sintéticos tais como BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propil-galato) e TBHQ (terc-butil-hidroxi-quinona). O emprego destes compostos tem sido questionado quanto a sua inocuidade, motivando a busca por antioxidantes naturais que possam atuar isolados ou sinergicamente com outros aditivos em substituição aos sintéticos (SHYAMALA et al., 2005; GUERRA & LAJOLO, 2005; GOMÉZ, 2003).

Estudos toxicológicos demonstram a possibilidade que estes antioxidantes sintéticos apresentam efeito tóxico, o Joint Committee on Food Additives (JECFA) da Food and Agriculture Organization (FAO) e World Health Organization (WHO) têm alterado nos últimos anos a Ingestão Diária Aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (GAZI et al., 2004; SOARES, 2002).

Há séculos as especiarias e ervas têm sido utilizadas não só para conferir sabor e aroma aos alimentos, mas também para a conservação. Segundo Gómez (2003), a atividade antioxidante das especiarias é devida, principalmente, a presença de compostos fenólicos

(tocoferóis, flavonóides e ácido fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas), ou carotenóides e ácido ascórbico.

Os compostos antioxidantes naturais podem agir como inibidores de radicais livres, agentes redutores, quelantes, sequestrantes do oxigênio singlet e desativadores de metais pró-oxidantes (GOMÉZ, 2003).

Os antioxidantes como compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis como BHA, BHT e tocoferóis, são denominados de antioxidantes primários, pois bloqueiam a ação dos radicais livres, transformando-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio aos elétrons, atuando também nas reações com radicais lipídicos, formando complexo antioxidante-lipídio (ARAÚJO, 2001). Podem atuar também como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992; ATOUI et al., 2000).

Os antioxidantes chamados sinérgicos são aqueles que atuam como removedores de oxigênio e complexantes. Agem na regeneração de radical fenoxil, doando hidrogênio e regenerando o antioxidante primário. Assim pode-se utilizar um antioxidante fenólico em menor quantidade quando for utilizado junto com um sinérgico. Como por exemplo, a vitamina C e o palmitato (ARAÚJO, 2001).

Dos compostos fenólicos com ação antioxidante encontrados nos vegetais são os flavonóides, que apresentam a capacidade de seqüestrar os radicais livres (DECKER, 1997; DORMAN et al., 2003). Dos 4000 flavonóides já encontrados, as maiores classes são flavonóis, catequinas ou flavonas, antocianidinas e isoflavonas (SUN et al., 2002).

Amplamente encontrados em plantas, os carotenóides são responsáveis pela cor de frutas e vegetais. São isoprenóides, constituídos geralmente por 8 unidades de isopreno, formando uma grande cadeia de polieno que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, permitindo a configuração *cis* e *trans* (FRASER & BRAMLEY, 2004). Atua no sistema de duplas ligações conjugadas, facilitando a captação de radicais livres, principalmente o radical alquilperoxila (TAPIERO et al., 2004). Segundo Morais et al. (2002), os carotenóides presentes em pimentas vermelhas têm demonstrado efeito protetor contra a fotoxidação.

Os carotenóides das pimentas são a capsorubina e a capsantina com a concentração de 30 a 60% do total de carotenóides de frutos inteiramente maduros (MATSUFUJI et al., 1998).

Topuz & Ozdemir (2007), detectaram em cultivares do *Capsicum annuum* através do CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) a concentração de carotenóides variando de 2310-2390 mg/Kg de base seca, vitamina A de 218,8 a 243,0 μg ERA/100g e vitamina C de 63,1-64,9 mg/100g na base molhada.

Howard et al. (2000), ao quantificar os carotenóides presentes em frutos imaturos e maduros de espécies do *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, constataram que as concentrações de β e α criptoxantina, β -caroteno, capsantina e zeaxantina em todas as pimentas aumentaram extensivamente com a maturação, e juntamente verificaram que a atividade antioxidante destas pimentas também aumentou. Na Figura 16 encontra-se a estrutura química de alguns carotenóides.

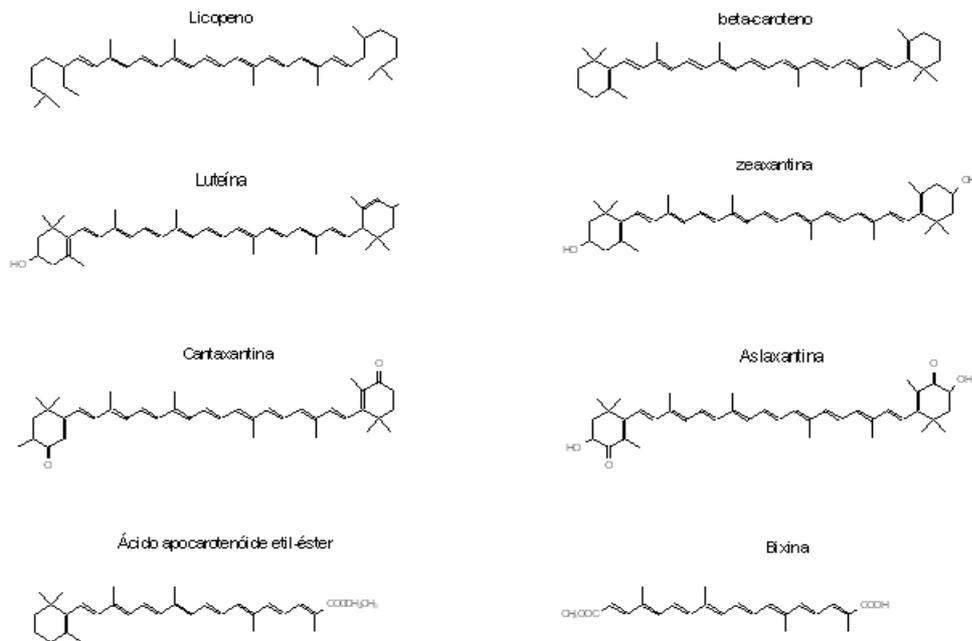


Figura 16 - Estrutura de alguns carotenóides

As pimentas *Capsicum* conforme Reifschneider et al. (2000), são fontes de três antioxidantes naturais: a vitamina C, vitamina E e carotenóides. A Vitamina E (Figura 17) é a forma vulgar de se referir aos tocoferol e tocotrienol, suas propriedades antioxidantes são estudadas há 60 anos (CERQUEIRA, 2007).

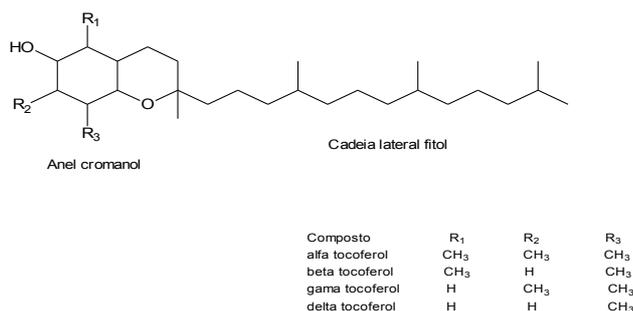


Figura 17 - Estrutura do Tocoferol

Conforme os estudos de Rosa et al. (2002), os capsaicinóides apresentaram atividade antioxidante interessante, pois inibiram a peroxidação dos lipídios, apresentando desempenho comparável ao tocoferol, Luteolina e BHT.

2.4.3. Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Muitas técnicas têm sido utilizadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, porém os métodos espectrofotométricos mais utilizados são o de seqüestro de radicais livres - DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O método DPPH consiste na redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), de coloração púrpura que absorve a 515 nm, relativamente estável, em solução alcoólica na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. O DPPH ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, muda sua coloração de violeta para amarelo (difenil-picril-hidrazina), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância (BRAND-WILLIANS et al., 1995; MOLYNEUX, 2004; ROGINSKY & LISSI, 2005). A ação antioxidante é expressa em % e pela quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, chamada de CE₅₀ (concentração eficiente) ou CI₅₀ (concentração inibitória) (SOUSA et al., 2007).

Sistema β - Caroteno/Ácido Linoleico

Enquanto o método DPPH baseia-se em transferir elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, o método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, determina a capacidade que um composto tem em proteger os lipídios da oxidação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O sistema β -caroteno/ácido linoleico baseia-se na descoloração do β -caroteno que absorve à 470 nm, em uma emulsão aquosa saturada de oxigênio, induzida pelos produtos da oxidação do ácido linoleico. A utilização de antioxidantes retardam a queda da absorbância do β caroteno, protegendo os substratos lipídicos da oxidação (MARCO, 1968; SOKMEN et al., 2004).

A atividade antioxidante (AA%) neste sistema é calculada em relação a 100% da oxidação da amostra controle (sem antioxidante).

TBARS

O método mais utilizado na avaliação da oxidação de lipídios em carnes e produtos é o teste de TBA ou TBARS. O teste de TBA- ácido 2-tiobarbitúrico, quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos e ácidos graxos poliinsaturados, formados durante o processo oxidativo (OSAWA et al., 2005).

O índice de TBA é expresso em miligramas de malonaldeído, dialdeído com três átomos de carbono, por quilogramas de amostra (ARAÚJO, 2001).

O teste fundamenta-se na reação do TBA com o malonaldeído, que quando aquecido em meio ácido, produz um composto de coloração avermelhada, que é medido em espectrofotômetro de 500 a 550nm. A quantificação do malonaldeído é feita a partir de curvas de calibração, com concentrações conhecidas de malonaldeído (ST. ANGELO, 1996).

Segundo Araújo (2001), o índice de TBA é um procedimento empírico, que fatores que podem afetar a intensidade da cor final do complexo, ou seja, na leitura do teste. Como por exemplo, a interferência na leitura causada pelos vários produtos resultantes da oxidação lipídica e outros componentes do alimento (açúcares, proteínas, nitrito, etc...), fazendo com que a reação não seja específica. Baixos valores também podem interferir na leitura, devido às ligações co-valente do malonaldeído com grupos amins livres presentes nas proteínas. Assim, o teste deve ser utilizado para medir a extensão geral da oxidação de lipídios e não para quantificar o malonaldeído.

2.5. Atividade Antimicrobiana

Os alimentos por serem ricos em nutrientes são naturalmente atacados por microrganismos que causam a perda de suas propriedades organolépticas, nutricionais e higiênico-sanitárias, muitas vezes causando doenças de origem alimentar que podem levar a morte.

Os microorganismos são distribuídos amplamente na natureza. As fontes de

microrganismos em alimentos podem ser as plantas, que possuem uma microbiota naturalmente presente, o ar, água, solo e animais. Os animais têm microrganismos presentes nos pêlos, perna, patas, couro e no intestino. A eliminação de microrganismo pelos animais contamina o meio ambiente e recomeça todo o ciclo (SOUSA, 2006).

A microbiota do alimento é constituída por microrganismos associados à matéria-prima e por contaminantes, que foram adquiridos durante os processos de manuseio e processamento dos alimentos. Assim, esses microrganismos podem contaminar os alimentos em qualquer um dos estágios de produção. A maior parte dos alimentos está sujeita as várias fontes potenciais de microrganismos, podendo ser controlados os níveis de contaminação e manter a microbiota em número aceitável pela legislação vigente, através de manuseio adequado, conhecimento e emprego de fatores que influenciam o crescimento de microrganismos em alimentos, dentre outras opções como o uso de produtos com ação antimicrobiana ou conservantes (LIMA et al., 2002).

A qualidade higiênico-sanitária sob a ótica da segurança alimentar tem sido amplamente estudada, pois as doenças veiculadas por alimentos são um dos principais fatores que contribuem para o índice de morbidade nos países da América Latina e do Caribe. O Comitê WHO/FAO admite que doenças de origem alimentar se apresentam, provavelmente, como o maior problema de saúde no mundo contemporâneo (WEINGOLD et al., 1994).

Segundo Califano et al. (2000), as doenças veiculadas por alimentos contaminados por microrganismos, são consideradas o maior problema de saúde pública no mundo.

Estima-se que por ano cerca de 5% a 10% da população sofre de Doenças de Origem Alimentar (DTA's), sendo a diarreia a maior causa de morbidade e mortalidade entre recém-nascidos e crianças até cinco anos de idade, onde mais de 70% dos casos são atribuídos a alimentos contaminados (GERMANO et al., 2002).

No intuito de evitar tais contaminações as indústrias além estabelecerem normas rigorosas de controle microbiológico, fazem uso de produtos químicos com ação antimicrobiana, ou seja, os aditivos químicos.

O uso de aditivos na indústria de alimentos tem possibilitado a obtenção de produtos de boa aparência e bom paladar, que apresentam uma vida de prateleira longa, sem perder seu valor nutricional e suas características. No atual nível de desenvolvimento tecnológico da indústria de alimentos, estas substâncias.

Os aditivos são ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos, objetivando modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante a

fabricação, processamento, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento e transporte de alimentos. Estes são classificados quanto à função que exercem no alimento, como os antioxidante, aromatizantes, corantes, preservativos, conservantes, emulsificantes, edulcorantes, umectantes, antiulectantes, intensificadores de sabor e enzima (CARVALHO, 2005).

Muito se especula quanto aos efeitos tóxicos e possivelmente carcinogênicos dos aditivos químicos utilizados em alimentos. Cada vez mais os consumidores buscam melhoria na qualidade de vida por meio de uma alimentação mais saudável. Fazendo com que as empresas busquem insensatamente produtos naturais, condimentos e especiarias que tenham ação antimicrobiana e que garantam segurança alimentar ao consumidor.

2.5.1. Bactérias causadoras de doenças de origem alimentar

Algumas bactérias são preocupações constantes para indústria de alimentos, pois veiculam doenças de transmitidas por alimentos–DTA's e afetam as propriedades organolépticas dos alimentos, tornando-os desagradáveis ao consumo. Entre elas podemos citar as Gram-positivas e Gram-negativas que se diferenciam pela composição da parede celular.

A parede celular das bactérias é responsável pela manutenção da forma bacteriana, desempenhando papel importante na divisão celular. As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças marcantes quanto à composição da parede celular (Figura 18 e 19). A camada composta de peptidoglicano confere rigidez à parede celular, que nas bactérias Gram positivas atinge de 15 a 50 % da massa seca da célula e nas Gram negativas não ultrapassa 5% (RANG et al., 1997).

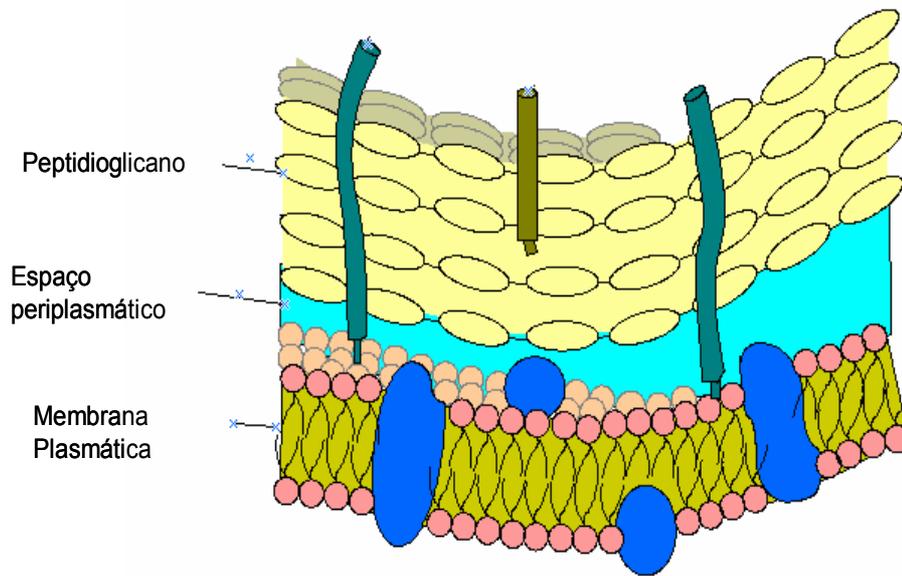


Figura 18 - Parede celular de uma bactéria Gram positiva

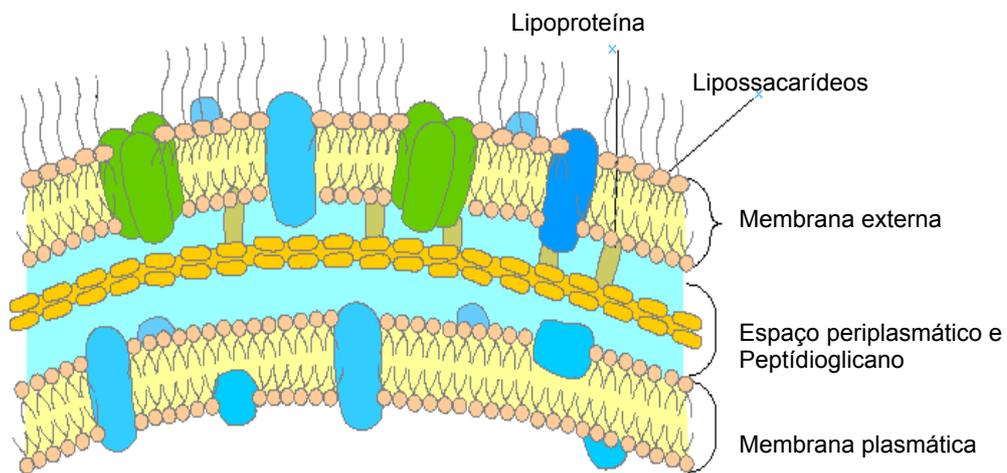


Figura 19 - Parede celular de uma bactéria Gram negativa

Gram positivas

Bacillus cereus

É uma bactéria do gênero *Bacillus*, anaeróbio facultativo, formador de esporos e pertencente à família *Bacillaceae* (JAY, 1994). O *Bacillus cereus* produz a síndrome diarréica durante sua multiplicação no intestino delgado humano, enquanto que na síndrome emética as toxinas são formadas previamente no alimento. Esta bactéria produz uma toxina emética e termo-resistente (126°C/90minutos), responsável por alterações do leite pasteurizado e produtos lácteos (PANETTA et al., 2006).

Há mais de 40 anos o *Bacillus cereus* é reconhecido como agente etiológico de doenças de origem alimentar (GHELARDI et al., 2002). Tem o solo como o seu habitat natural, mas devido a resistência de seus esporos, está amplamente distribuído na natureza, contaminando os vegetais, cereais, condimentos, carnes, laticínios, sopas e pratos a base de vegetais (MINNARD et al., 2001). Por apresentarem grande capacidade de multiplicação o *Bacillus cereus*, pode contaminar diferentes alimentos, desencadeando intoxicações alimentares perigosas.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus são cocos anaeróbios facultativos, ocorrendo isolados, aos pares e em aglomerados. Está relacionado a casos e surtos de intoxicação alimentar, pois produz uma enterotoxina formada no alimento contaminado (SILVA & GANDRA, 2004).

Estas enterotoxinas são termoestáveis estando nos alimentos mesmo após o cozimento (JAY, 1994; SILVA JR., 2005). O período médio de incubação da enterotoxina estafilocócica é de 2 a 4 horas. Os sintomas são geralmente agudas e se caracterizam por náuseas, vômito, cólicas abdominais e diarreia, com recuperação em 24 a 48h (GERMANO & GERMANO, 2001). O *S. aureus* é um dos maiores contaminantes do leite, pois está relacionado com infecções intramamárias de fêmeas no período de lactação, provocando a mastite em bovinos (ZECCONI & HAHN, 2000).

Os alimentos envolvidos em surtos de DTA's são: saladas (batata, atum, ovos); bolos recheados, doces tortas; leite cru; sorvetes.

Clostridium perfringens

O *Clostridium perfringens* é um importante agente causador de toxinfecção alimentar

(SCHULZA & BATISTAB, 2006). Bactéria em forma de bastonete, esporogênica, distribuída amplamente na natureza, que faz parte da microbiota normal do homem e animais (JAY, 1994; SILVA JR., 2005). Os alimentos envolvidos nas gastroenterites causadas pelo *Clostridium perfringens* são: Produtos cárneos (bovina e aves); molhos; tortas; saladas; queijos tipo frescal.

Listeria monocytogenes

A *Listeria monocytogenes* é bacilo, anaeróbico facultativo (JAY, 1994), resistente a sucessivos congelamentos e descongelamentos (GERMANO & GERMANO, 2001). Multiplica-se em temperaturas baixas de refrigeração (0°C a 44°C). Esta presente em 64% dos alimentos refrigerados (SILVA JR., 2005). Esta bactéria é encontrada no leite e derivados quando não pasteurizados corretamente. O consumo de alimentos contaminados pela *Listeria monocytogenes*, pode levar a meningoencefalite, sintomas semelhantes aos da gripe, pneumonia, endocardite, conjuntivite e aborto (PEARSON & MARTH, 1990; SILVA JR., 2005).

Gram negativas

Salmonella

Pertencente a família das enterobactereaceae não produtora de esporos e anaeróbia facultativa (JAY, 1994). Representa atualmente o mais importante microrganismo envolvido em contaminações oriundas de alimentos que utilizam o frango como base. Apresenta assim grande importância em saúde pública, por ser patogênica ao ser humano e por ser um indicador reconhecido mundialmente para detecção de contaminantes em alimentos (RUCHERT et al., 2006).

A *Salmonella* é distribuída amplamente na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal reservatório natural. As salmoneloses associadas a laticínios são frequentemente causadas devido ao consumo de leite cru e derivados que não foram pasteurizados corretamente. Já os produtos que levam ovos como ingrediente (sorvetes, saladas e outras preparações caseiras), são frequentemente envolvidos em surtos de salmonelose (FRANCO et al., 1996). A *Salmonella typh* causa infecção intestinal com disenteria, febre, choque endotóxico e morte, a *S. paratyphi* causa doenças entéricas e as enterocolites são causadas pelas demais *Salmonellas* (JAY, 1994; SILVA JR., 2005).

Escherichia coli

A *E. coli* é uma enterobactéria que não possui esporos, anaeróbica facultativa (JAY, 1994). Esta bactéria causa infecção do trato urinário, doenças diarréicas, meningite neonatal e gastroenterite (MURRAY et al., 2004). A contaminação dos alimentos pela *E. coli* ocorre via matéria fecal presente em água e alimentos.

Shigella

A *Shigella* é um bacilo, imóvel e cepas de respiração aeróbia e anaeróbia. São os patógenos mais comuns entre as enterobacteriaceae. Responsável pelas endocordites (desintéria bacilar), muito raramente invasiva. A *Shigella* pode ser transmitida pelas mãos, moscas, alimentos e fezes (MURRAY et al., 2004).

Yersinia enterocolítica

A yersiniose é uma doença humana causada pela *Yersinia enterocolítica*, que apresenta sintomas gastroentéricos variáveis de acordo com a pessoa infectada, associando-se geralmente à enterocolite ou linfadenite mesentérica. Pode também estar acompanhada de outras complicações sépticas em crianças, idosos e pessoas debilitadas ou imunocomprometidas (GERMANO & GERMANO, 2003). A *Yersinia enterocolítica* é uma bactéria psicrótrófica, que tem a capacidade de se multiplicar sob condições de refrigeração (SILVA JR., 2005).

2.5.2. Antimicrobianos

Antimicrobianos são definidos como substâncias químicas que inibem o crescimento microbiano, sendo denominados bacteriostáticos, e os que destroem os microrganismos, chamados bactericidas. Esses agentes podem ser produzidos partindo-se de outros

microorganismos, como bactérias e fungos, obtidos de plantas ou também podem ser totalmente ou parcialmente sintetizados (SILVA, 1999).

Alguns estudos têm demonstrado que além da atividade antimicrobiana sobre dado microrganismo, compostos de plantas apresentam também atividade contra linhagens de microrganismos resistentes a antibióticos, como também o efeito sinérgico entre compostos de plantas associados a outros compostos vegetais, ou ainda a antibióticos inativos, potencializando sua atividade (COUTINHO et al., 2004).

As substâncias ativas encontradas nas plantas medicinais são os produtos do metabolismo primário, os quais são substâncias indispensáveis à vida vegetal sendo produzidas graças à fotossíntese (MIGUEL & MIGUEL, 2004). O segundo tipo de substâncias é composto pelos produtos do metabolismo secundário, que é constituído de produtos, embora não essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie (SIMÕES et al., 2001).

Esses metabólitos secundários produzidos por plantas garantem a perpetuação da espécie, atuam no seu mecanismo de defesa contra a predação por microorganismos, insetos e herbívoros, estresse fisiológico e fatores ambientais (HARBORNE, 1988; COWAN, 1999; SANTOS, 2001). Por esse motivo a composição dos princípios ativos das plantas podem variar em função da espécie vegetal, local de origem, condições climáticas, métodos de extração/destilação e condições de armazenamento (HUYGHEBAERT, 2003). Realmente as espécies possuem interface química entre elas e o meio ambiente ao redor, assim sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Segundo Rhodes (1994), a ação dos metabólitos na natureza é determinada pelas necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, onde a evolução paralela das plantas, insetos, microorganismos e mamíferos levaram a síntese de metabólitos secundários, que por se apresentarem como fatores de interação entre organismos, normalmente possuem propriedades biológicas interessantes.

Os principais grupos de compostos com propriedade antimicrobiana, extraídos de plantas são classificados conforme suas características físicas, químicas ou atividade biológica. Tais compostos são os óleos essenciais, alcalóides, glucosídeos, compostos fenólicos, saponinas, mucilagens, terpenóides, flavonóides e taninos (MARTINS et al., 2003).

Os compostos fenólicos presentes em plantas além de contribuírem para o sabor, odor e coloração de diversos alimentos, apresentam atividade biológica, entre elas antimicrobiana. Pertencem a uma classe de compostos que inclui uma diversidade de

estruturas, simples e complexas, possuindo um ou mais anéis aromáticos, um ou mais grupamentos hidroxila. Pertencem aos compostos fenólicos os ácidos fenólicos, derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas, ligninas e taninos (SIMÕES et al, 2001).

Segundo Domingo & Lopes-Brea (2003), a toxicidade dos compostos fenólicos frente aos microrganismos, estão diretamente relacionados ao local e número de grupos hidroxilas (OH) presentes no anel aromático, de forma que quanto maior a hidroxilação maior será toxicidade. O mecanismo parece estar relacionado com a inibição enzimática por compostos oxidados, possivelmente relacionados aos grupos sulfídricos e por interações específicas com as proteínas. Dentro deste grupo estão os compostos fenólicos como a capsaicina do gênero *Capsicum*.

Outro grupo de composto fenólico com ação antimicrobiana são os flavonóides, que segundo Sartori (2005), são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, justificando assim sua ação frente a vários microrganismos. Os flavonóides apresentam habilidade de complexação com a parede bacteriana, os flavonóides mais lipofílicos podem lisar a membrana microbiana.

Outra classe de compostos com ação antimicrobiana são os terpenos, que conforme Cowan (1999) e Bogamboula et al. (2004), são ativos contra diversos microrganismos, especula-se que sua ação envolva a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos.

Dorman et al. (2000), sugerem que o rompimento das paredes celulares das bactérias se deve ao caráter lipofílico dos extratos que se acumulam nas membranas. As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa que contém lipossacarídeos, formando uma superfície hidrofílica. Este caráter hidrofílico cria barreira de entrada das substâncias hidrofóbicas como os óleos essenciais.

A parede celular das bactérias Gram positivas são compostas de aproximadamente 90% de peptidoglicano diferenciando das Gram negativas que são mais complexas (TRABULSI et al., 2004).

Conforme Tegos et al. (2002), as bactérias principalmente as Gram negativas apresentam grande capacidade de resistência aos antimicrobianos devido às mutações genéticas. Possuem também uma membrana que restringe a entrada de compostos anfipáticos, as chamadas Bombas de Compostos Multidrogas (MDRs). Os mesmo autores testaram inibidores de MDR's associando as plantas com ação antimicrobiana sobre várias bactérias, e verificaram uma atividade bem superior do que quando usados antes da associação de

MDR's, mostrando que o sinergismo obteve melhor desempenho contra as bactérias.

Segundo Kim et al. (1995) os componentes lipofílicos de extratos vegetais (entre eles os terpenos) exercem atividade antimicrobiana por interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular por aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo aqueles envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais e inativação ou destruição de material genético.

Com algumas exceções, em geral as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis do que as bactérias Gram-negativas aos compostos lipofílicos dos vegetais. Tais compostos podem apresentar dificuldade para penetrar na membrana externa, devido a barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas, embora não seja totalmente impermeável (BAGAMBOULA et al., 2004).

Os antimicrobianos segundo Trabulsi et al. (2004), podem influenciar sobre a parede celular e/ou membrana celular, afetar a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou síntese de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microrganismos.

Hefnawy et al. (1993), estudando os efeitos de sálvia, pimenta-jamaica, noz-moscada, cominho, alho, páprica, pimenta-vermelha, pimenta-preta e pimenta-branca em carnes processadas, sobre cepas de *Listeria monocytogenes*, verificaram que existe diferença entre os condimentos, e, de todos eles, a sálvia parece ser o mais eficiente.

Bara & Vanetti (1998) avaliaram entre outros condimentos e especiarias, a atividade antimicrobiana da páprica e do pimentão (*C. annuum*) frente a *E. Coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*. Verificaram que a páprica foi um dos corantes com menor bioatividade e o pimentão não exerceu qualquer efeito antibacteriano.

Vaijayathimala et al. (2000), frente a *Cândida albicans* obteve um CIM/ CLM de 37, 5 mg/ml para o extrato alcoólico do fruto maduro do *Capsicum annuum L* e CIM/CLM de 18,7 mg/ml de extrato alcoólico do fruto imaturo.

Já nas pesquisas de Dorantes et al. (2000), o extrato do *Capsicum annuum* obtiveram efeito inibitório em *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *B. cereus* e *S. aureus*.

Careaga et al. (2003) em seus estudos com extratos da pimenta sino (gênero *Capsicum*) frente à *Salmonella typhimurim* constaram que a concentração mínima inibitória para *S. typhimurium* em carne foi de 1,5 ml/100 g da carne. A adição de 1%, 2%, 3% e 4% do cloreto de sódio ao extrato não teve nenhum efeito inibitório adicional a *Salmonella*. Com

Pseudomonas aeruginosa concentração de 0,3 ml do extrato/100 g da carne mostrou efeito bacteriostático, quando uma concentração de 3 ml/100 g de carne mostrou efeito bactericida. Quando 1% de Cloreto de sódio foi adicionado à carne junto com o extrato, a concentração necessária para matar a *Pseudomonas aeruginosa* foi reduzida.

Acero-Ortega et al. (2005) em sua pesquisa para determinar os efeitos e as interações de pH (4,5, 5,5 e 6,5), de temperatura (2, 7 e 12°C) e de extrato do *capsicum* a concentração (0%, 5%, 10%) no crescimento dos *Listeria monocytogenes*, constataram que a temperatura não mostrou nenhum efeito antibacteriano, entretanto a concentração do extrato (5%) e o valor de pH (4,5) tiveram efeito relevante nas contagens microbianas.

Carvalho et al. (2005), através do método de IINB (Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana) e IINAB (Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana), obtiveram efeito bacteriostático do extrato alcoólico de pimenta malagueta a 50% frente a *E. coli*, na concentração de 10^7 UFC/ml.

Para avaliar os efeitos da capsaicina, presentes nas sementes de páprica, nas dietas de frangos, Hernandez Velasco et al. (1996), mostraram que a associação do pH fecal com a presença da capsaicina na dieta, aumentou à resistência do organismo a invasão da *S. Enteritidis* e *S. Sallinarum*. Isso porque segundo Manzanillo et al. (2001) determinados extratos de plantas podem ter efeito “probiótico” *in vivo* por estimularem a flora intestinal produtora de ácido láctico.

Molina-Torres et al. (1998) mostraram que a capsaicina nas concentrações de 200 e 300 µg/ml não foram capaz de inibir o crescimento da *E. coli*. Para *P. salmonacearum* apresentou redução de apenas 20% do crescimento na concentração de 300 µg/ml de capsaicina. Obtendo efeito inibitório mais forte para *B. subtilis* nas concentrações de 50, 75 e 150 µg/ml.

Segundo Cichewicz et al. (1996), muitos trabalhos focalizaram um possível efeito antimicrobiano do gênero *Capsicum*, com métodos, solventes e tipos de tecidos vegetais variados, porém os resultados foram contraditórios.

Algumas bactérias conforme Flagan & Leadbetter (2005), são capazes de utilizar a capsaicina como nutriente para seu crescimento. Estes mesmos autores verificaram que das 25 cepas testadas, nove foram capazes de utilizar a capsaicina como fonte única de carbono, especialmente a *Variovorax sp.*, mas a maioria não utilizaram este composto como fonte de nitrogênio. Ficando as *Pseudomonas* as mais capazes de utilizar a Vanillinamina como fonte de carbono e nitrogênio.

2.5.3. Método CIM e CLM

A determinação da Concentração Inibitória Mínima-CIM e Concentração Letal Mínima-CLM são métodos de diluição *in vitro* amplamente utilizados para avaliar uma possível atividade antimicrobiana de compostos naturais ou sintéticos.

A CIM é definida como sendo a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo. É um método quantitativo, podendo ser usado tanto para amostras hidrossolúveis, como lipossolúveis (RIOS et al., 1988; TORTORA et al., 2000). Já o CLM é a menor concentração capaz de matar o microrganismo.

A determinação do CIM e CLM é obtida através de microdiluições ou macrodiluições sucessivas do agente antimicrobiano, a ser testado em meios de cultura sólidos ou líquidos, onde são semeados bactérias e fungos que após incubação, verifica-se a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento ou matar o microrganismo.

A CIM e CLM podem ser determinadas por métodos diretos de contagem, como microspopia e câmaras e eletrônicas ou por métodos indiretos de contagem como plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e pela turbidez óptica provocada pelo crescimento microbiano (KALEMBA & KUNICKA, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material

Foram utilizados frutos *in natura* de quatro espécies do gênero *Capsicum*, cultivadas com adubo orgânico no Viveiro da Ferticel Indústria de Fertilizantes Ltda, localizado no município de Guatembú, SC.

As espécies utilizadas foram a malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*). Os frutos foram cultivados no período entre o final de 2005 e início de 2006.



<p><i>Capsicum frutescens</i> pimenta malagueta</p>	 <p><i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> Pimentão magali</p>
 <p><i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> pimenta cambuci</p>	 <p><i>Capsicum baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> Pimenta cumari</p>

Figura 20 - Fotografias da pimentas malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*)

3.2. Extração e Fracionamento com Solventes Orgânicos

Foram utilizados os frutos *in natura*, com sementes, das quatro espécies de pimenta *Capsicum*, onde 1 Kg de cada pimenta foi picada com faca em pedaços pequenos. As amostras picadas foram maceradas, durante 48h, em solução hidro-alcóolica (etanol 96° GL) na proporção massa-volume de 1:6 (1Kg do fruto: 6 Litros de álcool) e posteriormente filtradas em papel filtro qualitativo. A solução hidro-alcóolica filtrada foi concentrada em Evaporador Rotativo a 40°C para eliminação do álcool, produzindo assim o extrato etanólico ou bruto (EB). O extrato bruto sofreu fracionamento líquido-líquido com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em ordem crescente de polaridade, resultando em fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC) e fração acetato de etila (FA). Para retirada dos solventes, os extratos fracionados passaram no Evaporador Rotativo a 40°C (Figura 21). Após a retirada do solvente os extratos e frações foram liofilizados para a retirada da água e dos possíveis resíduos de solvente, para então serem acondicionados em refrigerador.

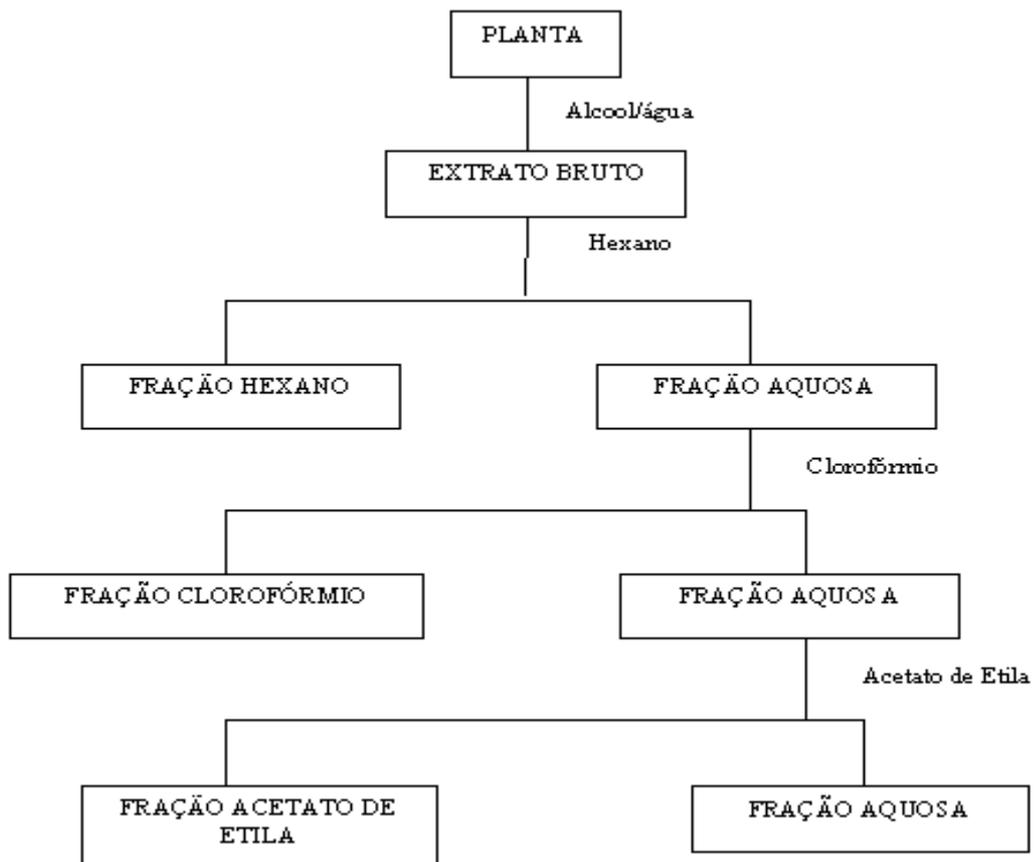


Figura 21 - Fluxograma do processo de obtenção dos extratos brutos e frações dos frutos c/sementes de espécies de pimentas *Capsicum*

3.3. Determinação do rendimento da extração e fracionamento das pimentas *Capsicum* com solventes orgânicos

O rendimento da extração e fracionamento das pimentas *Capsicum* com solventes orgânicos, foi realizado com base no peso dos frutos *in natura* e do peso seco por meio da determinação da matéria seca conforme metodologia de Silva & Queiroz (2002).

Coletou-se 200 g de amostra que foi identificada, pesada e em seguida levada à estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 h. Decorrido esse tempo, retirou-se a amostra da estufa e pesou-se novamente. A razão entre o peso do material retirado da estufa e o material original, multiplicado por cem, $(ME/MO \times 100)$, tem a matéria pré-seca ou *amostra seca ao ar* (ASA).

Em seguida esse material foi moído e peneirado. Retirou-se uma fração de aproximadamente 2 g, que foi colocado em “cadinho pesa filtro”, com peso pré-determinado, levado à estufa à 105°C por 24 h. Após esse tempo, retirou-se as amostras, e pela razão $[(\text{peso do cadinho} + \text{amostra pós estufa}) - (\text{peso do cadinho} + \text{amostra antes da estufa})] \times 100$ tem-se a *amostra seca a estufa* (ASE).

Calculou-se a matéria seca, multiplicando-se o valor obtido da ASA com a ASE e dividi-se por 100.

3.4. Determinação de Capsaicinóides

Para determinar o teor de Capsaicinóides do extrato bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*), utilizou-se a metodologia descrita por Sadasivam & Manikkam (1992), no qual a concentração é estimada pela medida espectrofotométrica da cor azul formada pela redução do ácido fosfomolibídico à ácido fosfomolibidênico.

Pesou-se 0,05 g dos extratos brutos e fracionados das pimentas estudadas, que foram diluídas em 100 ml de água destilada, retirou-se 1 ml desta solução que foi misturada em 5 ml de NaOH a 0,4% e 3 ml de ácido fosfomolibídico a 3%. A mistura foi deixada em repouso ao abrigo de luz por 1 hora. Após o período de reação, a absorbância das amostras foi lida através do espectrofotômetro de UV visível (marca SCINCOSUV, modelo 2120), no comprimento de onda de 650 nm em UV visível. A absorbância do branco (5 ml de NaOH a 0,4% + 3ml de ácido fosfomolibídico a 3%), foi medido para comparação e avaliação do decréscimo da cor azul nas cubetas experimentais contendo as amostras.

A curva foi construída misturando-se a solução de Capsaicinóides a 100% (65% de

Capsaicina, 20% de Dihidrocapsaicina e 15% de Homodihidrocapsaicina) em diferentes concentrações em 5ml de NaOH a 0,4%, 3 ml de ácido fosfomolibdico a 3%. Realizou-se a leitura das concentrações em espectrofotômetro a 650nm.

As análises foram efetuadas em duplicata com três repetições. As concentrações de capsaicinóides foram obtidas através do gráfico da curva padrão, referente à absorbância lida para todas as amostras, utilizando-se de regressão linear no programa de Software Excel. Os resultados foram expressos em mg de Capsaicinóides por 100 g de amostra.

Os dados foram submetidos a análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa Estatistic 6.0.

3.5. Determinação de Fenólicos Totais

O reagente Folin-Denis descrito pelo método 9110 da AOAC (1980), foi utilizado para determinação dos fenólicos totais do extrato bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*).

Inicialmente foi preparada a solução supersaturada de carbonato de sódio e o reagente Folin-Denis (187 ml de água destilada, 25 g de tungstato de sódio, 5 g de ácido fosfomolibdico e 12 ml de ácido ortofosfórico). A mistura foi fervida em refluxo durante duas horas, após o resfriamento foi diluída em água 1:1 e acondicionada em recipiente protegido da luz. Em seguida foi preparada solução padrão de catecol diluindo-se 0,1 g de catecol em 100 ml de água destilada, transferiu-se 10 ml desta solução inicial para um balão volumétrico de 100 ml, que foi completado com água destilada até atingir o menisco.

Para preparação da curva de calibração do catecol foram pipetadas diferentes alíquotas da solução padrão de catecol, em balões volumétricos de 100 ml contendo 5 ml de reagente de Folin-Denis e 10 ml da solução de carbonato de sódio, que foram completadas até o menisco com água destilada. As concentrações foram homogeneizadas em Vortex e deixadas em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos, para então serem realizadas as leituras em espectrofotômetro de UV visível (marca SCINCOSUV, modelo 2120) a 760 nm.

Os ensaios foram realizados diluindo-se 0,05g de extratos e frações das pimentas, em 100ml de água destilada em balão volumétrico. Transferiu-se 1ml desta solução para outro balão de 100 ml contendo 5 ml de reagente Folin-Denis, 10 ml de solução supersaturada de carbonato de sódio e completou-se com água. Foram mantidas em repouso e ao abrigo da luz por 30 minutos. Preparou-se o branco para o controle negativo.

A quantidade de fenólicos totais foi obtida através da seguinte equação:

$$\text{Fenólicos Totais} = \frac{\text{leitura (mg/ml)} \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

Onde: Leitura é a concentração de catecol obtida na curva de calibração de catecol referente a absorvância lida para a amostra.

Os testes foram feitos em duplicata com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa Estatistic 6.0.

3.6. Análise da Atividade Antioxidante *in vitro*

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos Extratos Bruto e as Frações Hexânica, Clorofórmica e Acetato de Etila, da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) e BHT (butil hidroxitolueno) foram utilizadas duas metodologias: Sistema β -Caroteno/ácido Linoléico e DPPH (2,2-difenil-1-picrililhidrazila).

Para este teste foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4 (quatro extratos e quatro pimentas), controle negativo, controle positivo com BHT, três repetições sendo estas provenientes de duplicatas.

3.6.1. Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico

A atividade antioxidante foi determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico seguindo a metodologia descrita por Marco (1968).

Para a preparação da emulsão β -caroteno/ácido linoléico adicionou-se 1 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio, homogenizou-se e transferiu-se 1 mL desta solução para um balão de fundo redondo contendo 25 μ L de ácido linoléico e 200 μ L de Tween 40. O clorofórmio da mistura foi evaporado em rota evaporador a 40° C, por 10 minutos. Após a evaporação foi adicionada a mistura 50 ml de água destilada aerada (saturada em oxigênio por 30 minutos), e em seguida agitada para formar emulsão.

Foi retirado 5 ml da emulsão de β -caroteno/ácido linoleico para a leitura do branco, para o controle positivo misturou-se 5 ml da emulsão com 0,2 ml de BHT e pipetou-se 5 ml

da emulsão para adição de 1 mg de extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das quatro espécies de pimentas estudadas. Em seguida foram aquecidas em banho maria a 50°C por 15 minutos e depois resfriadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 470 nm em intervalos de 15 minutos por 2 horas. A atividade foi determinada em porcentagem (%) de Atividade Antioxidante (AA) conforme equação descrita a baixo:

$$\%AA = \frac{100 - (\text{Absorbância Inicial} - \text{Absorbância Final}) \text{ Amostra}}{(\text{Absorbância inicial} - \text{Absorbância Final}) \text{ Branco}} \times 100$$

As análises foram realizadas em duplicata com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) e Dunnett (5%) através do programa Estatistic 6.0.

3.6.2. Determinação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O método utilizado para a determinação da atividade antioxidante via radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi desenvolvido por Brand-Willians et al. (1995), com modificações por Mensor et al. (2001).

Inicialmente foi preparada a solução estoque de DPPH, onde 2 mg de DPPH foi solubilizado em 50 mL de álcool metílico 96%. Para a solução das amostras, pesou-se 40 mg dos extratos de cada pimenta estudada, que foram misturadas em 10 mL de álcool metílico 96%.

Em tubos contendo 1mL da solução stok de DPPH, adicionou-se álcool metílico 96% e a solução das amostras nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml de amostra, de forma que a solução final tivesse 2,5 mL. Foram homogeneizadas e deixadas em repouso ao abrigo de luz por 30 minutos. Um controle negativo foi feito com 1,5 mL de metanol (96%) e 1 mL de solução DPPH. Para o controle positivo pipetou-se 0,8 mL de BHT que foram misturados a 1 mL da solução stok de DPPH e 0,7 mL de álcool metílico 96%.

Após 30 minutos, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro de UV visível (marca SCINCOSUV, modelo 2120) e converteu-se em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) utilizando a seguinte equação:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Absorbância da amostra})}{(\text{Absorbância controle})} \times 100$$

Os dados do método DPPH também podem ser interpretados pelo CE_{50} , ou seja, a concentração da amostra onde 50% da atividade antioxidante (antiradical) é observada, foram calculados por regressão linear na faixa de concentração entre 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, pois nesta concentração de 50% de atividade antioxidante a curva se apresentava em linha reta, enquanto após a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ a curva se transformava em uma constante, impossibilitando o cálculo de CE_{50} pois os valores ficam negativos.

Os testes foram feitos em duplicata com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa Estatistic 6.0

3.7. Análise antioxidante pela determinação do número de TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico em Almôndegas assadas

3.7.1. Ingredientes para formulação das almôndegas

A formulação das almôndegas foi baseada em recomendações comerciais e os ingredientes adquiridos em supermercados da cidade de Chapecó. Encontram-se na Tabela 2 a formulação das almôndegas.

Tabela 2 - Formulação das almôndegas

Ingredientes	(%)
Carne bovina moída (coxão mole)	38,46
Gordura suína moída	19,23
Carne suína moída (pernil)	11,53
Proteína de soja	7,69
Água	15,38
Cloreto de Sódio	1,18
Cebola	4,23
Alho desidratado	2,3
Nitrato de Sódio	0,000057

3.7.2. Preparação das almôndegas

A carne bovina, suína, gordura suína e proteína de soja hidratada foram misturadas manualmente à parte. Os outros ingredientes foram misturados separadamente, para então serem acrescentados a massa base da matéria-prima e novamente homogeneizados.

Foram misturados 50 mg de cada extrato e frações das pimentas *Capsicum* a porções de 500g de massa base; para o controle positivo homogeneizou-se 1,0 ml de BHT em 500g de massa base e para o controle negativo (branco) utilizou-se apenas 500g de massa base.

As almôndegas foram modeladas com 50g cada, assadas a 200°C em forno convencional por 40 minutos, após resfriadas foram acondicionadas em papel filme e mantidas em geladeira a 12° C.

3.7.3. Análise Química

As amostras de almôndega foram moídas em máquina apropriada. Em seguida, todas as amostras foram mantidas em estufa de ventilação forçada a 65°C, por 72 horas. Quando retiradas, constituíram-se na “matéria pré-seca gordurosa” (MPSG), que foi tratada com éter de petróleo e passou a ser designada matéria pré-seca pré-desengordurada (MPSPDG). Em seguida, a MPSPDG foi processada em moinho de bola e acondicionada em sacos plásticos.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa/MG, efetuando-se a preparação da solução mineral para determinação de proteína, lipídio, cinzas, cálcio e fósforo de acordo com a metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

3.7.4. Determinação do número de TBARS

Para avaliar a extensão da oxidação dos lipídios nos tratamentos das almôndegas com os extratos e frações das pimentas, foi utilizado o teste de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, segundo o método descrito por Tarladgis (1964), modificado por Raharjo et al., (1992) e adaptado por Jô & Ahn (1998).

Utilizou-se tetraetoxipropano (TEP) (1 mL de solução estoque diluído em 50 mL de água) para elaboração da curva padrão. Concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mL desta solução TEP foram misturadas a 5ml de TBA e água destilada, de forma que as concentrações finais ficassem em 1×10^{-8} , 2×10^{-8} , 3×10^{-8} , 4×10^{-8} , 5×10^{-8} , 6×10^{-8} e 7×10^{-8} .

Preparadas cada uma das soluções para curva, realizou-se a leitura no espectrofotômetro de UV visível (marca SCINCOSUV, modelo 2120) a 530nm para a determinação da absorbância.

Inicialmente foram pesadas 3 g de amostra das almôndegas e homogeneizadas em 9 mL de água. Em seguida adicionou-se 50 µL de solução de BHT e 240 µL de solução de

sulfanilamida. Foi retirado 3 mL do homogenato e colocado em tubo de centrífuga (Microprocessada QUIMIS) com 6 mL da solução de TBA-TCA (Ácido 2-Tiobarbitírico e Ácido Tricloroacético), seguido de aquecimento por 15 minutos a 95°C. Após resfriamento as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, para então a leitura ser realizada em espectrofotômetro de UV visível (marca SCINCOSUV, modelo 2120) a 530nm.

O cálculo do número do TBARS (mg de malonaldeído/Kg de amostra) foi realizado através da equação abaixo:

$$TBA = \frac{Absr. \times F \times \text{peso da amostra}}{10}$$

Onde:

Absr: absorbância do sobrenadante da amostra (almôndegas) centrifugada lida a 530nm.

Para a obtenção do F (Fator de correção) foi necessário calcular o “d” (Coeficiente angular).

Coeficiente angular “d” e calculado da seguinte forma:

$$d = \frac{Y2 - Y1}{X2 - X1}$$

$$F = d \times \text{Fator de correção}$$

Y1: absorbância encontrada para a solução TEP 7×10^{-8}

Y2: absorbância encontrada para a solução TEP 1×10^{-8}

X1: 7×10^{-8}

X2: 1×10^{-8}

Fator de correção = $7,2 \times 10^{-7}$

Os testes foram feitos em duplicata com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) e Dunnett (5%) através do programa Estatistic 6.0.

3.8. Atividade Antimicrobiana

3.8.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados para realização da pesquisa foram: *Escherichia coli*

(ATCC8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Shigella dysenteriae* (NCTC7919), *Yersinia enterocolitica* (CDC175), *Clostridium perfringens* (NCTC8798), *Listeria monocytogenes* (ATCC19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC14502), *Bacillus cereus* (ATCC14579), adquiridos liofilizados da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

3.8.2. Preparação dos Inóculos Bacterianos

As bactérias liofilizadas foram ativadas em tubo contendo 0,5 ml de caldo nutritivo e incubadas a 35°C por 48h. Transcorrido o período de incubação, alíquotas de cada cultura ativada foram repicadas em três tubos contendo 15 ml de Ágar nutritivo inclinado e incubadas a 35°C por 24h. Após o período de incubação, transferiu-se uma alíquota de cada cultura bacteriana para tubos contendo 5 ml de solução salina a 0,8% de NaCl.

A turvação da suspensão bacteriana foi padronizada de acordo com a escala nefelométrica de MacFarland em 0.5 que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias por mililitros).

3.8.3. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do extrato bruto (EB) e frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e de acetato de etila (FA), obtidos das pimentas malagueta (*C. frutescens*), cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*), cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) e pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), foram realizadas pela microdiluição em caldo caseína de soja, conforme metodologia da AOAC (1995).

A massa inicial utilizada para a análise microbiológica dos EB, FH, FC e FA das espécies estudadas foi de 40 mg. Os extratos e frações foram dissolvidos em 208 µL de metanol (solução estoque). Foram transferidos 200 µL da solução estoque para tubos contendo 1300 µL de caldo caseína de soja (solução trabalho).

O inóculo foi preparado a partir de 100 µL da suspensão bacteriana na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml para tubos contendo 5 mL de caldo caseína de soja.

O mapa das aplicações foi feito em placas de poliestireno para cultura de células, com 96 poços de fundo chato, identificação alfa-numérica e previamente esterilizadas com raios gama (Figura 22).

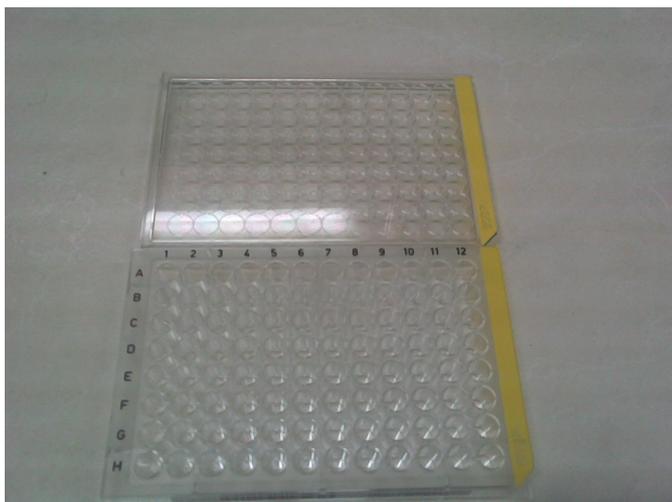


Figura 22 - Placa de cultura de células para identificação do CIM e CLM dos extratos e frações de pimentas *Capsicum*

Uma alíquota de 100 μL de caldo caseína de soja pura foi transferida para todos os poços da última fileira (controle negativo), em seguida foi adicionado 100 μL do meio com inoculo em todos os poços das 12 fileiras restantes. Após foi transferida a solução trabalho no primeiro poço em triplicata, homogeneizando bem o conteúdo do primeiro poço e posteriormente transferindo 100 μL para o poço seguinte correspondente a próxima concentração, repetiu-se a diluição até o oitavo poço e descartaram-se os 100 μL restantes. As microdiluições foram feitas nas concentrações 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 mg/ml. As placas tampadas foram incubadas em estufa a 35° C por 24h. Para controle positivo foi utilizado o clorofenicol com concentração inicial de 0,0135 mg/ml. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas com auxílio do revelador Cloreto de Trifenil Tetrazólico (TTC), que indica crescimento microbiano (coloração avermelhada ao meio). Após a determinação da CIM, transferiu-se 10 μL dos poços que não tiveram crescimento microbiano para placas de Petri contendo ágar nutriente esterilizado. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35° C por 24h. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas, para determinação da CLM dos extratos e frações *Capsicum*.

Realizou-se análise descritiva dos dados em duplicata e com três repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Rendimento da Extração e Fracionamento das Pimentas *Capsicum* com Solventes Orgânicos

Observa-se na Tabela 3 que a pimenta malagueta apresentou o melhor rendimento, enquanto que o pimentão e as pimentas cambuci e cumari os menores. Entre as frações obtidas, a FH sempre apresentou melhor rendimento.

Tabela 3 – Rendimento da extração e fracionamento das pimentas *Capsicum* com solventes orgânicos

Pimenta	Massa Seca (%)	EB Frações (%)			
		g/100 g de massa seca	Hexânica	Clorofórmica	Acetato de Etila
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (pimentão)	10,62	2,97	23,90	5,39	4,38
<i>C. frutescens</i> (malagueta)	28,21	7,52	32,58	31,12	12,23
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (cambuci)	9,78	1,34	43,28	17,16	26,12
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> (cumari)	27,41	2,01	45,77	17,91	18,41

4.2. Quantificação de Capsicinóides

Os capsaicinóides são compostos fenólicos presente nas pimentas responsáveis pela pungência (CARVALHO & BIACHETTI, 2004).

As concentrações de capsacinóides encontrados para o extrato bruto e fracionados das espécies *C. frutescens* (malagueta), *C. annuum* var. *annuum* (pimentão magali), *C. baccatum* var. *pendulum* (cambuci), *C. baccatum* var. *praetermissum* (cumari) estão apresentados na Tabela 4.

Os resultados obtidos para a pimenta cumari, demonstram que a fração clorofórmica apresentou maior ($P < 0,05$) concentração de capsacinóides seguida da FA, enquanto que o extrato bruto e fração hexânica menor ($P < 0,05$) concentração, não diferenciando entre si. Este resultado foi observado também para a pimenta malagueta.

A FC e FA da pimenta cambuci apresentaram maior ($P < 0,05$) concentração de capsacinóides em relação ao EB e FH, que não diferenciaram entre si.

Tabela 4 - Concentração de Capsaicinóides (mg/100 g) no extrato bruto e fracionado de pimentas *Capsicum*

Pimenta	Extrato e Frações	Capsaicinóides (mg/100 g)
<i>C. frutescens</i> (malagueta)	Bruto	9,22±0,35e
	Hexânico	4,76±0,83e
	Clorofórmico	235,80±8,16c
	Acetato de Etila	125,11±12,74d
Média		93,72C
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (pimentão magali)	Bruto	3,52±0,41e
	Hexânico	10,58±0,10e
	Clorofórmico	11,52±0,18e
	Acetato de Etila	11,58±0,37e
Média		9,30D
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (cambuci)	Bruto	6,17±0,10e
	Hexânico	10,81±0,53e
	Clorofórmico	234,62±9,35c
	Acetato de Etila	248,75±15,40c
Média		125,09B
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> (cumari)	Bruto	10,58±0,27e
	Hexânico	9,05±0,31e
	Clorofórmico	560,80±16,69a
	Acetato de Etila	515,24±21,49b
Média		274,24A

Letras iguais, minúsculas (média dos extratos) e maiúsculas (média das pimentas) na mesma coluna não diferem ($P>0,05$) pelo teste Tukey.

O pimentão magali foi a espécie que apresentou menor ($P<0,05$) concentração de capsacinóides, com o extrato bruto e suas frações não apresentando diferença entre si.

Entre todos os extratos e frações analisados a fração clorofórmica da pimenta cumari, apresentou maior ($P<0,05$) concentração de capsacinóides. Pimenta esta extremamente pungente.

Em ordem crescente de concentração de capsacinóides (mg/100 g de extrato) por tipo de pimenta observou-se: pimentão<malagueta<cambuci<cumari.

A Figura 23 ilustra os resultados, onde as maiores concentrações são encontrados nas frações clorofórmica e acetato de etila e menor no extrato bruto e fração hexânica. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de solventes mais polares (BERTOLDI, 2006), extraírem normalmente maior quantidade de fenólicos, e os capsacinóides fazem parte desta classe de compostos.

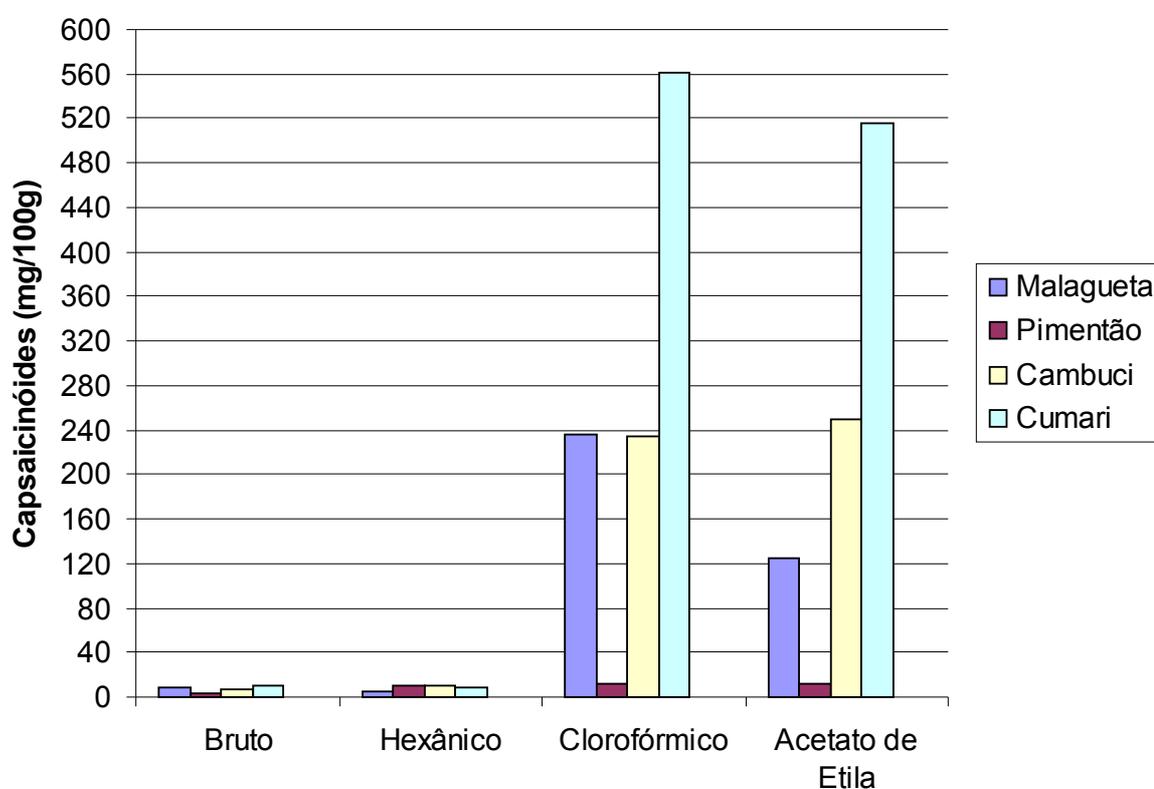


Figura 23 - Concentração de capsaicinóides (mg/100 g de extrato) em função do tipo extrato da pimenta *Capsicum*

Das dez variedades de extratos brutos de pimentas *C. annuum* pesquisados por Deepa et al. (2007), foram encontrados concentrações de capsaicina variando de 776-1440 μ g/100g para pimentas imaturas (verdes) e 277-1529 μ g/100g para pimentas maduras (vermelhas). Resultados inferiores aos determinados no presente trabalho.

Materska et al. (2005) obtiveram para extrato metanólico de *C. annuum* L., 0,442mg/g de capsaicina e 0,317mg/g de dihidrocapsaicina para frutos imaturos, para frutos

maduros 0,530mg/g de capsaicina e 0,350mg/g de dihidrocapsaicina.

Govindarajan et al. (1987) determinaram para algumas espécies de pimentas a concentração capsaicinóides. Entre as espécies estudadas encontram-se a *C. baccatum* e *C. pubescens* com baixos valores de capsaicinóides (0,106 a 0,358%), *C. annuum* valores que variaram entre as espécies (0,098 a 1,477%), *C. frutescens* e *C. chinense* (0,264 a 1,218%). Os mesmos autores constataram que diferentes solventes extraem variáveis concentrações de capsaicinóides de *C. annuum var. accuminatum L.*, extração com álcool (0,523%), acetona (0,515%), clorofórmio (0,587%), éter (0,701%) e hexano (0,605%). Nesta pesquisa os resultados da extração com solventes apolares foram melhores que as com solventes polares. Resultado contrário ao encontrado no presente trabalho.

Perucka et al. (2000) determinaram concentrações de capsaicinóides em extrato metanólico de *C. annuum L.* por meio de espectrofotômetro e CLAE, 0,706 mg/g e 0,715 mg/g respectivamente. Constataram que a determinação de capsaicinóides por espectrofotômetro foi comparável ao CLAE. Já Topuz & Ozdemir (2007), encontraram para cultivares de *C. annuum* a concentração de capsaicinóides que variou de 471,3 a 688,1 mg/Kg na base seca.

Pino et al. (2007) comprovaram a concentração de capsaicinóides com a cor (vermelho, alaranjados e marrom) de 10 pimentas *C. chinense* cultivados em Cuba. Verificaram que o índice de capsaicinóides das pimentas variou de 41,8 a 65,9 mg/100 g da fruta seca. Especificamente os cultivares alaranjados foram os mais pungentes com concentração de capsaicinóides de 55 mg/100 g da fruta seca enquanto os vermelhos 45 mg/100 g da fruta seca.

4.3. Fenólicos Totais

Os fenólicos englobam grande número de compostos presentes na natureza. Tais compostos têm sido muito pesquisados principalmente por inibirem a oxidação lipídica, agindo como sequestradores de radicais e em alguns casos como quelantes de metais (SOARES, 2002).

A concentração de fenólicos totais, expressos em equivalente de catecol por 100g de amostra, encontrados para o extratos bruto e frações das espécies *C. frutescens* (malagueta), *C. annuum var. annuum* (pimentão magali), *C. baccatum var. pendulum* (cambuci), *C. baccatum var. praetermissum* (cumari) estão apresentados na Tabela 5.

A pimenta malagueta apresentou maior ($P < 0,05$) concentração de fenólicos totais na

fração clorofórmica, seguida do acetato de etila. As menores ($P < 0,05$) concentrações encontram-se no extrato bruto e fração hexânica.

Ao analisar os resultados das pimentas cambuci e cumari, constatou-se que as maiores concentrações de fenólicos totais foram extraídos pelos solventes clorofórmio e acetato de etila, não havendo diferença entre eles. Para os EB e FH as menores concentrações, sem diferença significativa entre eles.

Tabela 5 - Concentração de Fenólicos Totais (mg/100g) de extrato bruto e fracionado de pimentas do gênero *Capsicum*

Pimenta	Extrato e Frações	Fenólicos Totais* (mg/100g)
<i>C. frutescens</i> (malagueta)	Bruto	173,19±6,65f
	Hexânico	173,19±6,65f
	Clorofórmico	13.311,79±186,63b
	Acetato de Etila	10.725,71±2632,8c
Média		6.095,97B
<i>C. annuum</i> (pimentão magali)	Bruto	139,95±10,16f
	Hexânico	228,60±29,98f
	Clorofórmico	208,6±10,16f
	Acetato de Etila	135,52±10,16f
Média		178,18D
<i>C. baccatun var. baccatun</i> (cambuci)	Bruto	135,52±10,16f
	Hexânico	40,21±6,65f
	Clorofórmico	8.031,88±645,52d
	Acetato de Etila	7.277,61±493,79d
Média		3.871,30C
<i>C. baccatun var. praetermissum</i> (cumari)	Bruto	177,63±7,68f
	Hexânico	126,65±6,65f
	Clorofórmico	16.867,65±186,63a
	Acetato de Etila	16.975,41±186,63a
Média		8.536,83A

* Dados expressos como miligramas equivalentes de catecol por 100g de extrato.

O pimentão apresentou concentrações inferiores ($P < 0,05$) de compostos fenólicos, quando comparado com as demais espécies, não havendo diferença significativa entre o extrato bruto e as frações.

Através da Figura 24 visualiza-se que a maior concentração de fenólicos totais encontra-se na pimenta cumari, seguido malagueta, cambuci e por último pimentão. Analisando os dados observou-se que as frações mais polares foram as que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos. Resultados semelhantes aos obtido pelo presente trabalho para o EB do *C. annuum var. annuum*, foram apresentados por Hassimoto et al. (2005), para extratos metanólicos de *C. annuum var. annuum*, utilizando reagente Folin

Ciocalteu, com 119 mg/100 g para pimentas verdes e 131 mg/100g para vermelhas.

Deepa et al. (2007) encontraram nos extratos etanólico de dez espécies de *C. annuum* L., 186 a 1122 mg/100 g de fenólicos totais para frutos verdes e 323 a 852 mg/100 g para frutos vermelhos.

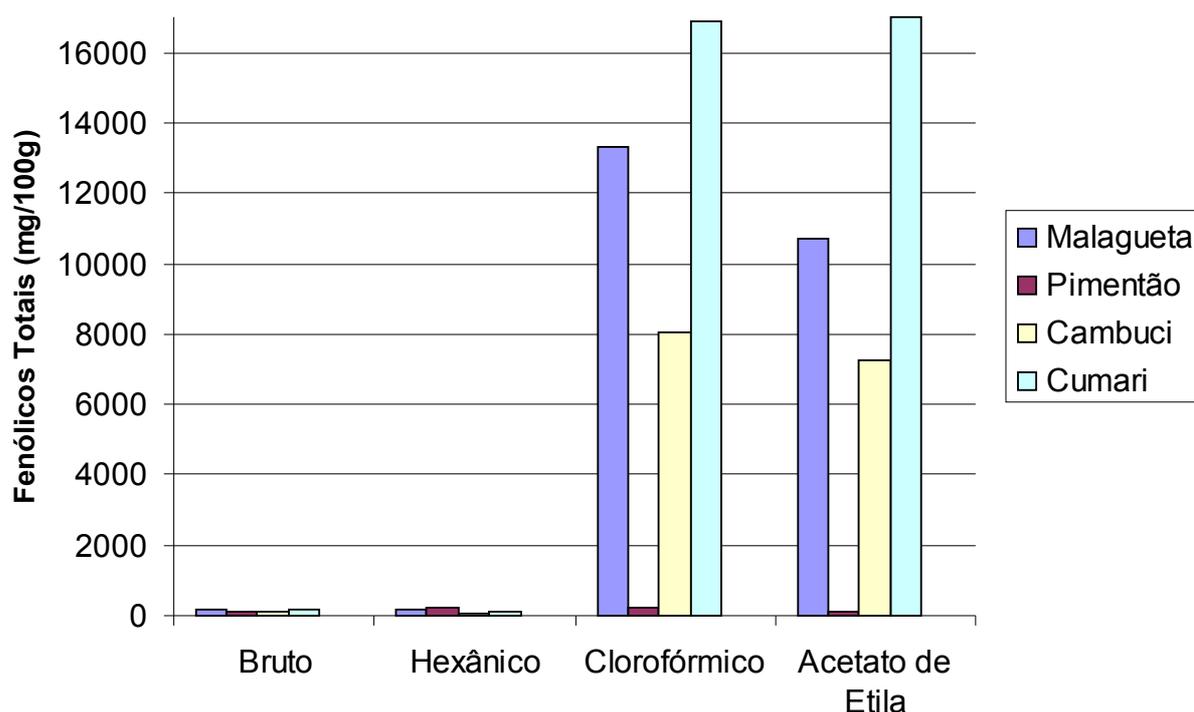


Figura 24 - Concentração de Fenólicos Totais expressos em miligrama de equivalente de catecol por 100 g de extrato, em função do tipo de extrato e pimenta *Capsicum*

Howard et al. (2000) utilizando o reagente Folin Ciocalteu para extratos metanólicos de pimentas *Capsicum*, encontraram de 2846 a 5707 mg/Kg de fenólicos totais em frutos maduros de quatro espécies de *C. annuum* e imaturos 2565 a 3548 mg/Kg, para os frutos imaturos do *C. frutescens* 5244 mg/Kg e maduros 5136 mg/Kg e para a espécie *C. chinense* frutos maduros 4042 mg/Kg de fenólicos totais. Demonstrando a correlação positiva entre o aumento da maturidade com a concentração de fenólicos para a maioria das pimentas testadas. O contrário foi relatado por Marin et al. (2004), onde houve decréscimo do conteúdo de fenólicos com o estágio de maturação do verde para vermelho.

4.4. Atividade Antioxidante

4.4.1. Sistema β Caroteno Ácido Linoleico

Os resultados da atividade antioxidante (%) pelo Sistema β -Caroteno Ácido Linoléico, dos extratos bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*) e pimenta cumari (*C. Baccatum* var. *praetermissum*), encontram-se na Tabela 6 e ilustrado na Figura 25.

Tabela 6 - Atividades antioxidantes (%) dos extratos bruto e fracionados de pimentas *Capsicum* e BHT, pelo Sistema β Caroteno/Ácido linoleico

Pimentas	Extrato e Frações	Atividade Antioxidante %
<i>C. frutescens</i> (Malagueta)	EB	87,80 \pm 1,21 ab
	FH	85,07 \pm 1,15 bc
	FC	82,63 \pm 1,63 bc
	FA	*62,53 \pm 7,52 d
	Média	79,53 B
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (pimentão magali)	EB	*33,76 \pm 5,69 f
	FH	*47,82 \pm 2,42 e
	FC	*35,54 \pm 2,68 f
	FA	*30,80 \pm 5,53 f
	Média	36,98 C
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (cambuci)	EB	96,97 \pm 3,03 a
	FH	*77,78 \pm 1,75 bc
	FC	*78,79 \pm 3,03 bc
	FA	96,97 \pm 0 a
	Média	87,63 A
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> (cumari)	EB	*75,76 \pm 3,03 c
	FH	*62,63 \pm 6,31 d
	FC	81,81 \pm 0 bc
	FA	86,87 \pm 4,63 abc
	Média	76,77 B
Aditivo sintético	BHT	88,65 \pm 1,23

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (média dos extratos) e maiúsculas (média das pimentas) na coluna, não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

*Médias diferentes ($>$ ou $<$) em relação ao antioxidante sintético (BHT), pelo teste Dunnett a 5%.

Observou-se que o EB da malagueta (*C. frutescens*) apresentou a maior ($P < 0,05$) atividade antioxidante e a FA a menor ($P < 0,05$), ficando a FC e FH com valores intermediários. Comparando-se com o antioxidante sintético (BHT), o EB, FH e FC da malagueta obtiveram mesma ação antioxidante, e a FA com atividade inferior ($P < 0,05$).

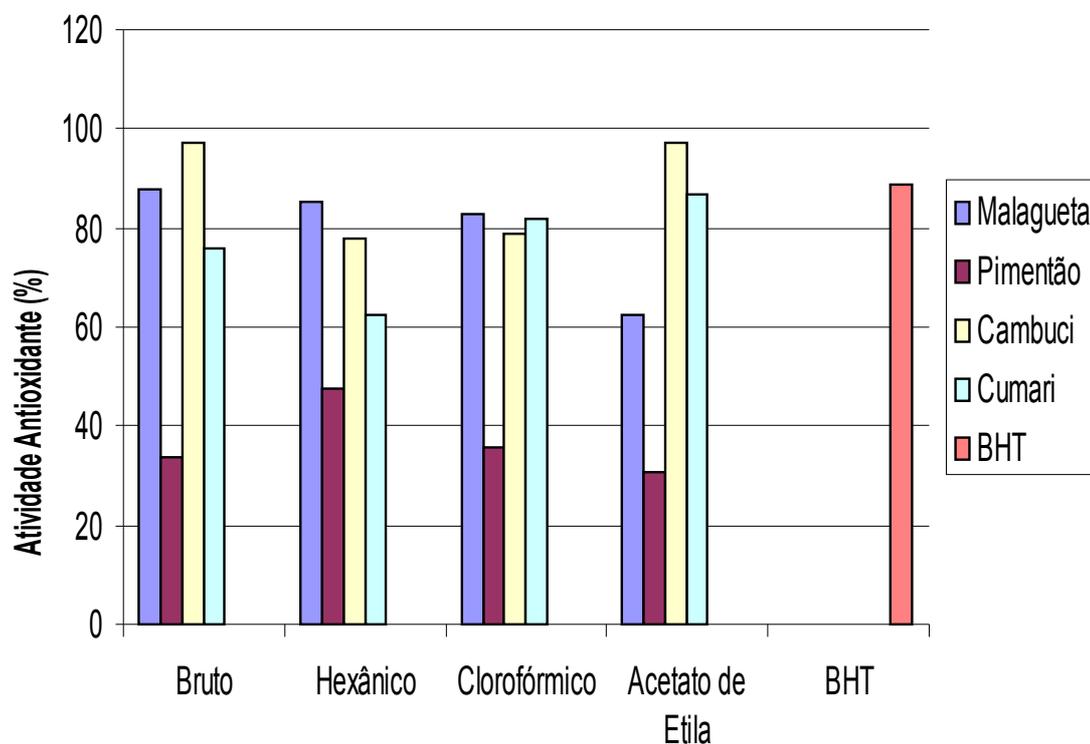


Figura 25 - Atividade antioxidante (%) do extrato bruto e fracionado de pimentas *Capsicum*, pelo sistema β Caroteno/Ácido Linoleico

Em virtude da pimenta malagueta ter apresentado maior concentração de fenólicos nas frações clorofórmica e acetato de etila e menores na hexânica e no extrato bruto, esperava-se que as frações com maiores concentrações de fenólicos apresentassem maior atividade antioxidante. Porém, observou-se o contrário, principalmente com a fração acetato que apresentou menor atividade antioxidante. Este resultado deveu-se possivelmente pela presença da vitamina C extraída nesta fração, que agiu como pró-oxidante, uma vez que, segundo Markus et al. (1999) e Reifschneider (2000) este gênero se apresenta como boa fonte deste nutriente. Conforme Hassimoto et al. (2005), o ácido ascórbico pode atuar como pró-oxidante, pois ao doar os dois hidrogênios redutores, fica susceptível a receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é agente oxidante.

O resultado para a atividade antioxidante do extrato bruto e fração hexânica da pimenta malagueta deveu-se principalmente pela ação sinérgica entre os compostos presentes (EB) e a presença de capsantinas e criptoxantina (FH), carotenóides encontrados nas pimentas *Capsicum*, que apresentam ação antioxidante. Segundo Young & Lowe (2001) e

Tapiero et al. (2004), os carotenóides apresentam propriedades antioxidante devido principalmente ao sistema de duplas ligações conjugadas, fazendo com que sejam capazes de capturar os radicais livres.

Howard et al. (2000), obteve para o extrato metanólico da pimenta tabasco (*C. frutescens*), fruto maduro, 91,85% de atividade inibitória da oxidação pelo sistema β Caroteno/Ácido Linoleico, e correlacionou o efeito antioxidante com as concentrações crescentes de carotenóides nos frutos maduros: 414 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β criptoxantina, 1252 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de α caroteno, 1187 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de β caroteno, 1443 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de capsantina e 1958 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de zeaxantina.

Para o pimentão magali (*C. annuum*) a maior ($P<0,05$) atividade antioxidante foi obtida pela FH, sendo os menores valores atribuídos ao EB, FC e FA, que não diferenciaram estatisticamente entre si. O extrato bruto e todas as frações obtiveram valores inferiores ($P<0,05$) ao BHT. Tais resultados podem ser explicados possivelmente pela baixa concentração de carotenóides, bem como pelos níveis inferiores de capsaicinóides e fenólicos totais encontrados no extrato bruto e suas frações.

Observou-se que o EB e FA da pimenta cambuci (*C. baccatum var. pendulum*), apresentaram maior ($P<0,05$) ação antioxidante com desempenho igual ao BHT, ficando a FH e FC com menor ($P<0,05$) atividade e inferiores ao BHT.

O desempenho do extrato bruto da pimenta cambuci provavelmente ocorreu pela presença de carotenóides e outros compostos antioxidantes que interagiram entre si, proporcionando melhor ação antioxidante, pois extratos altamente polares como etanol e metanol segundo Simões et al. (2001), extraem heterosídeos em geral, praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica, apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%.

A ação antioxidante do extrato acetato de etila da pimenta cambuci justifica-se pela presença significativa de capsaicinóides e fenólicos totais encontrados nesta fração. Apesar do extrato clorofórmico ter apresentado a mesma concentração de capsaicinóides e fenólicos totais que a fração acetato de etila, sua ação antioxidante possivelmente foi afetada por outros compostos que interagiram de forma negativa neste sistema.

Para a pimenta cumari (*C. baccatum var. praetermissum*), as frações acetato de etila e clorofórmica obtiveram os melhores resultados, com ação igual ao BHT, ficando a FH com a menor ($P<0,05$) ação antioxidante e o EB com atividade intermediária, ambos com valores inferiores ao BHT.

Os resultados apresentados pelas frações acetato de etila e clorofórmico da pimenta cumari, pode ser explicado pela alta concentração de capsaicinóides e fenólicos totais extraídos por estes solventes. Já os valores do EB e FH podem ser explicados pela pouca quantidade de compostos como os carotenóides, além das baixas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais detectados neste extrato e fração.

Ao analisar os resultados percebeu-se que a pimenta cambuci apresentou a maior ($P < 0,05$) ação antioxidante, seguida da pimenta malagueta e cumari, sendo a menor ($P < 0,05$) atividade obtida pelo pimentão.

Visualiza-se na Figura 25 que a ação antioxidante do extrato bruto foi maior que a fração acetato de etila, com menor ação as frações hexânica e clorofórmica. Onde a melhor atividade foi obtida pela FA e EB da pimenta cambuci, enquanto que o EB e todas as frações do pimentão atingiram a menor ação antioxidante. Isso porque os resultados dependem segundo Dorman et al. (2003), da natureza e estrutura química dos compostos fenólicos presentes no extrato. Também porque os compostos que possuem ação antioxidante podem variar em função da espécie de pimenta, das condições de cultivo da mesma e da forma de extração, afetando diretamente a atividade inibitória do extrato (DEANS et al., 1987).

Utilizando como parâmetro a classificação de Hassimotto et al. (2005), onde valores de inibição $>70\%$ apresentaram uma boa ação, intermediária para valores de 40 a 70% de inibição e baixa para $<40\%$ inibição, observou-se que: os extratos e frações das pimentas malagueta, cumari e cambuci, apresentaram boa ação antioxidante sendo apenas o pimentão com valores menores, classificados como baixa atividade antioxidante.

Hassimotto et al. (2005), ao avaliar a atividade antioxidante *C. annuum* var. *annuum* na concentração de $50 \mu\text{M}$ de extrato metanólico pelo Sistema β - Caroteno/Ácido Linoleico, também obteve baixa ($<40\%$ inibição) ação antioxidante para pimenta doce verde, $31,4\%$ de inibição da oxidação, enquanto que para pimenta doce vermelha uma atividade de $49,2\%$ de inibição, considerada atividade intermediária ($40-70\%$ de inibição).

4.4.2. DPPH

O método DPPH avalia somente o poder redutor do antioxidante, que ao doar elétrons se oxida (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Os resultados da atividade antioxidante deste método foi descrito em Atividade Antioxidante (AA%) e como a concentração eficiente do composto (CE_{50}), capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%. Assim, a melhor atividade antioxidante foi atribuída aos menores valores de CE_{50} .

Encontram-se na Tabela 7 os resultados da atividade antioxidante (%) pelo método DPPH, dos extratos bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*.) e pimenta cumari (*C. Baccatum* var. *praetermissum*).

Observa-se que as frações acetato de etila e clorofórmico da pimenta malagueta (*C. frutescens*), apresentaram maior ($P < 0,05$) atividade antioxidante em todas as concentrações testadas, com desempenho igual a superior ao BHT em função da concentração. Tais resultados podem ser explicados pela considerável concentração de fenólicos totais e capsaicinóides determinados nestas frações. Enquanto que o extrato bruto obteve menor ($P < 0,05$) ação do que o BHT, provavelmente devido à interação negativa de compostos variados extraídos pelo etanol.

A atividade antioxidante do pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*) em média apresentou ação inferior ($P < 0,05$) ao BHT, ficando a fração clorofórmica apenas nas concentrações de 50 a 250 $\mu\text{g/ml}$ com ação igual ($P > 0,05$) ao BHT e a fração acetato de etila com desempenho superior ($P < 0,05$) ao BHT apenas nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g/ml}$. Isto demonstra que somente em altas concentrações as frações clorofórmica e acetato de etila foram eficientes doadores de elétrons para o radical DPPH. O extrato bruto obteve menor ação antioxidante mesmo apresentando concentrações de fenólicos e capsaicinóides iguais a suas frações.

Materska et al. (2005), ao avaliarem a atividade antioxidante da capsaicina e dihidrocapsaicina extraídos do *C. annuum* L., determinaram pelo método DPPH que a ação antioxidante da capsaicina foi maior que da dihidrocapsaicina, mostrando que a dupla ligação da cadeia lipídica da capsaicina influenciou na ação antioxidante. Acrescentou que a ação dos capsaicinóides pode ter sido influenciada pela presença dos grupos metoxi e OH na posição orto do anel aromático.

Tabela 7 - Atividades antioxidantes (%) obtidos em diversas concentrações dos extratos bruto e fracionados das pimentas *Capsicum* e BHT, pelo método DPPH

Pimentas	Extrato/ Frações	Concentração de Extrato/Frações (µg/ml)					
		5	10	25	50	125	250
<i>C. frutescens</i> (malagueta)	EB	*13,90±3,3 cd	*16,08±3,05 de	*20,13±5,3 de	*23,34±2,62 de	*46,01±13,4 de	*56,91±9,91 c
	FC	*40,69±5,60 a	40,71±9,06 ab	55,76±7,48 c	*55,76±1,56 de	*85,95±1,19 ab	86,41±1,22 ab
	FA	17,44±3,15 c	21,71±3,57 cd	39,95±3,36 c	*64,81±1,09 cd	*92,15±1,92 a	*95,90±2,97 a
Média		24,01 A	26,17 A	34,64 A	47,97 C	74,70 A	79,74 AB
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (Pimentão)	EB	17,29±1,32 c	*17,57±1,45 de	22,47±6,44 d	*23,51±6,43 g	*41,88±8,52 e	*58,40±2,03 c
	FC	*5,48±2,32 de	*10,59±9,19 def	*20,46±1,32 de	35,35±1,09 f	57,34±1,32 d	84,24±1,74 ab
	FA	0	0	*9,43±3,32 e	46,46±7,38 e	*90,68±3,31 bc	*96,40±1,08 a
Média		7,59 C	9,39 B	17,45 B	53,93 D	63,30 B	79,68 B
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> (cambuci)	EB	*3,09±0,29 e	*4,51±1,17 ef	10,63±1,24 de	*22,67±3,21 g	*45,57±2,01 de	82,00±2,18 ab
	FC	*13,98±3,64 c	*19,33±1,31 d	36,08±8,07 c	53,47±2,57 e	*76,78±4,5 b	88,89±1,77 ab
	FA	28,59±2,13 b	*52,31±5,10 a	*85,27±0,94 a	*85,64±0,78 a	*87,52±0,94 ab	*90,51±1,2 a
Média		15,22 B	25,38 A	43,99 A	53,93 B	69,96 A	87,71 A
<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i> (cumari)	EB	*1,09±0,19 e	*5,13±2,48 ef	*12,25±0,98 de	*28,63±3,80 fg	54,42±2,15 de	73,22±16,04 bc
	FC	*31,55±2,87 b	40,75±2,00 ab	*59,54±2,32 b	*74,81±1,75 bc	*83,63±0,73 ab	89,57±1,17 ab
	FA	18,83±2,45 c	34,48±3,61 bc	*57,25±1,99 b	*80,03±1,10 ab	*90,46±0,77 ab	*91,35±1,96 a
Média		17,16 B	26,79 A	43,01 A	61,16 A	76,17 A	84,71 AB
Sintético	BHT	21,76±3,4	31,52±1,17	32,90±6,8	43,58±12,5	60,1±5,03	77,02±0,97

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (média dos extratos) e maiúsculas (média das pimentas) na coluna, não diferem (P>0,05) pelo teste Tukey.

*Médias diferentes (> ou <) em relação ao antioxidante sintético (BHT), pelo teste Dunnett a 5%.

Observa-se que a FA da pimenta cambuci (*C. baccatum* var *baccatum*), ofereceu maior ($P<0,05$) contribuição para atividade antioxidante desta espécie, com uma capacidade doadora de elétrons superior ao antioxidante sintético BHT. Enquanto que a FC obteve maior ($P<0,05$) ação que o BHT apenas na concentração de 125 $\mu\text{g/ml}$, já o EB apresentou atividade igual ao BHT apenas na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$. A alta concentração de fenólicos totais encontradas na FA da pimenta cambuci, justifica a ação antioxidante superior ao BHT. A FC apesar de ter apresentado uma concentração de fenólicos totais igual ao FA, sua ação antioxidante pode ter sido afetada por outros compostos presentes nesta fração. As baixas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais no EB explicam sua menor atividade antioxidante quando comparado com as frações.

As frações clorofórmica e acetato de etila da pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*), atingiram em sua maioria ação antioxidante superior ($P<0,05$) ao BHT, o que se deveu provavelmente a elevada concentração de capsaicinóides e fenólicos totais detectadas nestas frações. Já o extrato bruto obteve uma ação antioxidante igual ao BHT apenas nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g/ml}$.

A atividade antioxidante das frações hexânicas não foram determinadas, pois os resultados se apresentavam abaixo de zero, impossibilitando o cálculo da atividade e o cálculo do CE_{50} através de regressão linear, podendo ser explicado devido à baixa concentração de fenólicos totais encontrada para esta fração. Segundo Wangenstein et al. (2004), a falta de capacidade doadora de hidrogênio dos extratos lipofílicos dificultam a análise de seus resultados pela metodologia do DPPH.

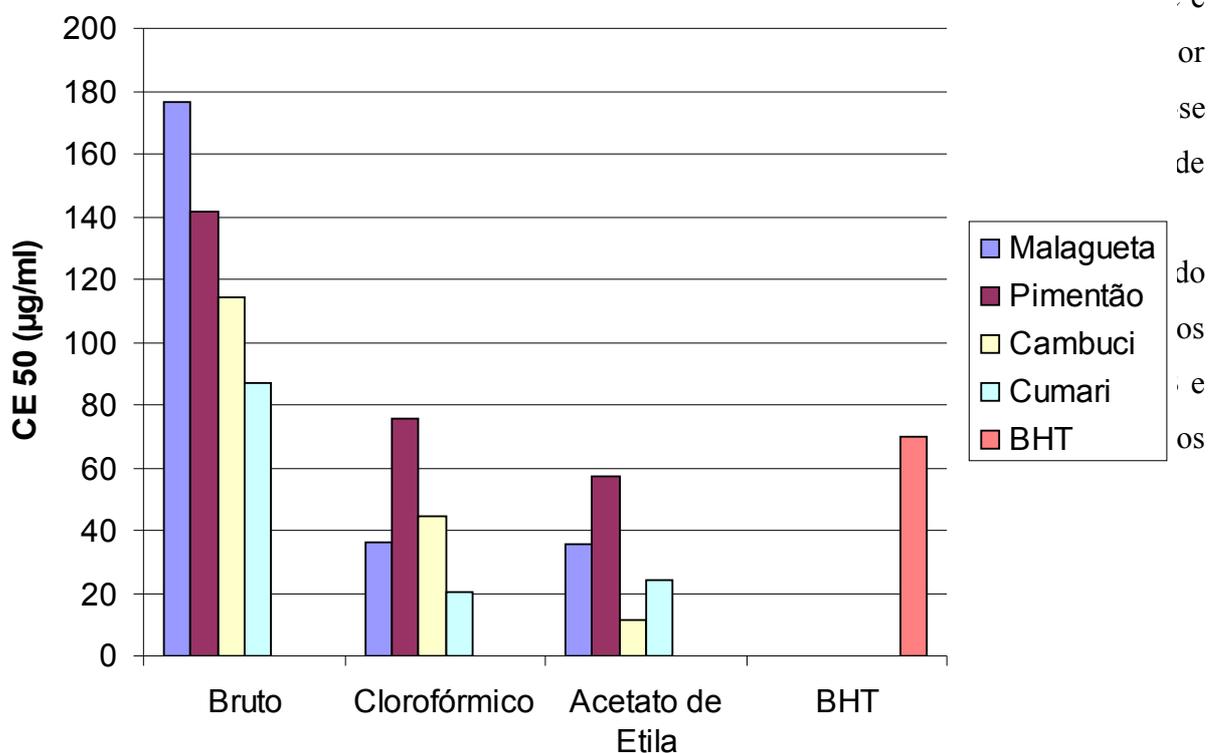


Figura 26 - Atividade antioxidante (CE_{50}) do extrato bruto e fracionado de pimentas *Capsicum*, pelo método DPPH

O extrato e frações da cumari apresentaram a maior ação doadora de elétrons ao radical DPPH, seguido da cambuci, malagueta e pimentão. O FC e FA obtiveram a melhor atividade antioxidante, quando comparado ao BHT e ao EB. Demonstrando correlação positiva entre ação antioxidante e as concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais encontradas nas frações polares (acetato de etila e clorofórmico).

Observou-se que o FA apresentou resultado contrário ao que foi obtido no Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico para malagueta e pimentão, isto porque o método DPPH, segundo Duarte-Almeida et al. (2006), avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar elétrons se oxida, não detectando substâncias pró-oxidantes como ácido ascórbico.

Constatou-se que a metodologia do radical DPPH detectou muito mais a ação antioxidante dos frações polares, que extraem os compostos fenólicos, do que extrato o bruto. Conforme Atoui et al. (2005), a atividade antioxidante dos fenólicos é devida principalmente as suas propriedades redutoras.

4.4.3. Análise Química das Almôndegas

A composição química das almôndegas encontra-se na Tabela 8. Observa-se que a

composição nutricional das almôndegas encontra-se dentro dos limites estabelecido pela Portaria n°. 574 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (BRASIL, 2000), onde o limite máximo de gordura é de 18%, máximo de 4% de proteína não carne, mínimo de 12% de proteína bruta, máximo de 0,45% na base seca de cálcio. Portaria esta que define almôndega como “o produto cárneo industrializado, obtido a partir da carne moída de uma ou mais espécies de animais de açougue, moldada na forma arredondada, adicionada de ingredientes e submetidos ao processo tecnológico adequado”.

Tabela 8 – Composição química das almôndegas condimentadas com extratos e frações de pimentas *Capsicum*

Nutriente	Quantidade (%)
Proteínas	20,32
Lipídios	17,46
Umidade	56,5
Cinzas	2,34
Cálcio	0,0024
Fósforo	0,092

4.4.4. Determinação do Número de TBARS

Os resultados da atividade antioxidante, pela determinação do número de substâncias reativas ao ácido 2-Tiobarbitúrico, dos extratos bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *baccatum*.) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*) estão na Tabela 9.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre pimenta, extrato e dia. Os valores do 7º dia foram menores ($P < 0,05$) que o 21º dia. Demonstrando que a oxidação ocorreu depois do 7º dia de armazenamento.

No 7º dia houve diferença somente entre as pimentas, onde foi observado que os menores ($P < 0,05$) valores foram obtidos pelas pimentas cambuci e cumari e os maiores ($P < 0,05$) para a pimenta malagueta e pimentão. Não havendo diferença ($P > 0,05$) entre os extratos, controle negativo e BHT.

Tabela 9 - Quantificação de substâncias reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico, em almôndegas condimentadas com extratos bruto e fracionados de pimentas do gênero *Capsicum* e BHT

Pimenta	Extrato/Frações (0,01%)	Quantificação de substâncias reativas ao TBA	
		7º Dia	21º Dia

<i>C. frutescens</i> (malagueta)	EB	0,247 ± 0,029	*0,419 ± 0,020bc
	FH	0,250 ± 0,006	*0,360 ± 0,016a
	FC	0,238 ± 0,017	**0,528 ± 0,018fg
	FA	0,239 ± 0,020	**0,543 ± 0,004g
Média		0,254 D	0,453B
<i>C. annuum</i> (pimentão magali)	EB	0,248 ± 0,012	**0,556 ± 0,018g
	FH	0,236 ± 0,051	**0,521 ± 0,005fg
	FC	0,238 ± 0,027	** 0,440 ± 0,018cd
Média		0,249 C	0,521C
<i>C. baccatun var.</i> <i>baccatun</i> (cambuci)	EB	0,246 ± 0,027	*0,412 ± 0,010bc
	FH	0,207 ± 0,017	** 0,469 ± 0,022de
	FC	0,174 ± 0,009	*0,373 ± 0,008ab
	FA	0,206 ± 0,032	** 0,438 ± 0,014cd
Média		0,208 A	0,425A
<i>C. baccatun vr.</i> <i>praetermissum</i> (cumari)	EB	0,192 ± 0,012	*0,428 ± 0,007cd
	FH	0,232 ± 0,050	*0,410 ± 0,020bc
	FC	0,236 ± 0,016	** 0,494 ± 0,018ef
	FA	0,197 ± 0,015	*0,417 ± 0,016bc
Média		0,214 B	0,450B
BHT		0,212 ± 0,007	*0,387 ± 0,035
Controle Negativo		0,213 ± 0,001	**0,543 ± 0,019

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (média dos extratos) e maiúsculas (média das pimentas) na coluna, não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey.

**Médias diferentes ($>$ ou $<$) em relação ao antioxidante sintético (BHT), pelo teste Dunnett a 5%

*Médias diferentes ($>$ ou $<$) em relação ao controle negativo, pelo teste Dunnett a 5%.

No 21º dia houve interação pimenta e extrato. A fração hexânica da pimenta malagueta apresentou a melhor atividade antioxidante, ficando a fração acetato de etila da malagueta, acetato de etila e extrato bruto do pimentão com a pior atividade antioxidante e os outros extratos e frações com valores intermediários. O desempenho dos extratos e frações quando comparados ao BHT e ao controle negativo também apresentaram diferença.

Observou-se que o valor de TBARS da fração hexânica da pimenta malagueta (*C. frutescens*) apresentou o menor ($P < 0,05$) valor seguido do extrato bruto, ambos com valores iguais ao BHT e menores ($P < 0,05$) que controle negativo. Efeitos semelhantes ao ocorrido no Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico. Pode-se dizer que a presença de vitamina E, carotenóides e outros compostos extraídos pelo álcool e hexano, além do sinergismo dos compostos, foram os responsáveis pela ação antioxidante destas frações, já que foram encontradas baixas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais nestes extratos. Porém as frações clorofórmica e acetato de etila obtiveram concentração de malonaldeído superiores ($P < 0,05$) ao BHT e igual ao controle negativo. Mesmo apresentando concentração significativa de fenólicos totais, estes não foram capazes de evitar a oxidação na almôndega,

talvez pela presença de compostos pró-oxidantes. Segundo Valko et al. (2004), os fenóis e polifenóis em algumas situações podem agir como pró-oxidantes, assim como a vitamina C e os carotenóides.

Para o pimentão (*C. annuum*) o extrato bruto e frações obtiveram valores de TBARS superiores ($P < 0,05$) ao BHT. Apresentaram efeito semelhante ao Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico. Possivelmente, tal resultado deveu-se pela baixa concentração de capsaicinóides e fenólicos totais detectados no extrato e frações desta espécie.

Martinez et al. (2006), ao avaliar o poder antioxidante de pós de pimenta doce vermelha e pimenta cayenne (*C. annuum*), na concentração de 2%, em salsichas de porco pelo método TBARS, obteve no 16º dia de armazenamento 0,60 mg/Kg de malonaldeído para pimenta cayenne e para pimenta doce vermelha 0,82 mg/Kg de malonaldeído.

A fração clorofórmica e extrato bruto da pimenta cambuci (*C. baccatun* var. *pendulum*), atingiram concentração de malonaldeído muito próximas entre si e iguais ao BHT. Já os valores da fração hexânica e acetato de etila foram maiores ($P < 0,05$) que do BHT, porém inferiores ($P < 0,05$) ao controle negativo. O extrato bruto e fração hexânica apresentaram efeito semelhante ao ocorrido no Sistema β Caroteno/Ácido Linoleico.

O desempenho do extrato bruto da cambuci deveu-se provavelmente pela presença de carotenóides e outros compostos que agiram de forma sinérgica proporcionando maior proteção contra a oxidação. A ação da fração clorofórmica justifica-se pela concentração de capsaicinóides e fenólicos totais detectados. A reduzida ação protetora da oxidação da fração hexânica provavelmente ocorreu pela baixa concentração de carotenóides, bem como pelos baixos valores de capsaicinóides e fenólicos totais extraídos por esta fração. No caso do extrato acetato de etila, apesar de apresentar altas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais, sua ação pode ter sido prejudicada pela ação pró-oxidante destes e outros compostos.

Constatou-se que as frações hexânica e acetato de etila da pimenta cumari (*C. baccatun* var. *praetermissum*), não diferenciaram entre si quanto ao número de TBARS, que foram iguais ao BHT, apresentando para a fração acetato etila efeito semelhante ao Sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico e DPPH. Isto pode ser explicado pela presença de carotenóides na fração hexânica e altas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais encontrados na fração acetato de etila.

Comparando a concentração de malonaldeído do BHT com o extrato bruto da pimenta cumari, percebeu-se resultados estatisticamente iguais. Efeito semelhante foi verificado pela metodologia do DPPH para atividade antioxidante na concentração de 250

$\mu\text{g/ml}$. O extrato clorofórmico obteve valores de TBARS maior que o BHT. A ação antioxidante do extrato bruto pode ser explicado pelo sinergismo de vários antioxidante que protegeram as almôndegas da oxidação. Para a fração clorofórmica, possivelmente a ação dos capsaicinóides e fenólicos totais, encontrados em alta concentração, podem ter agido como pró-oxidante neste sistema.

Mesmo nos valores mais altos de TBARS dos extratos e frações testados, nenhuma das pimentas atingiram a concentração de 1 mg/Kg de malonaldeído, pois segundo Djenane et al. (2002) um valor de TBARS de 1 mg/Kg é o limite para a percepção off-flavour.

Observou-se que a maior concentração de malonaldeído foi obtida pelas frações clorofórmica e acetato de etila. Porém os valores ainda estão muito próximos ao BHT e controle negativo (Figura 27), o que demonstra que o processo oxidativo não atingiu o seu ápice no 21º dia.

Oboh et al. (2006), constaram o efeito antioxidante do extrato aquoso de pimentas *Capsicum annuum* e *Capsicum chinense*, no impedimento da peroxidação de lipídios em células do cérebro de ratos (*In vitro*) induzidas com $25 \mu\text{M Fe}^{2+}$, por meio da metodologia do TBARS. O cultivar CAT (*C. chinense*) ficou com a maior ação protetora contra a peroxidação, explicou tal resultado pela possível concentração elevada de fenólicos totais e maior capacidade de quelar o Fe^{2+} .

Ao analisar os resultados das três metodologias utilizadas para testar a atividade antioxidante dos extratos bruto e fracionado do gênero *Capsicum*, foi observado que alguns resultados variaram entre as metodologias. Isso por que cada metodologia tem a sua especificidade e os compostos antioxidantes podem apresentar ação variada de um sistema para outro, devido ao sinergismo e agentes pró-oxidantes.

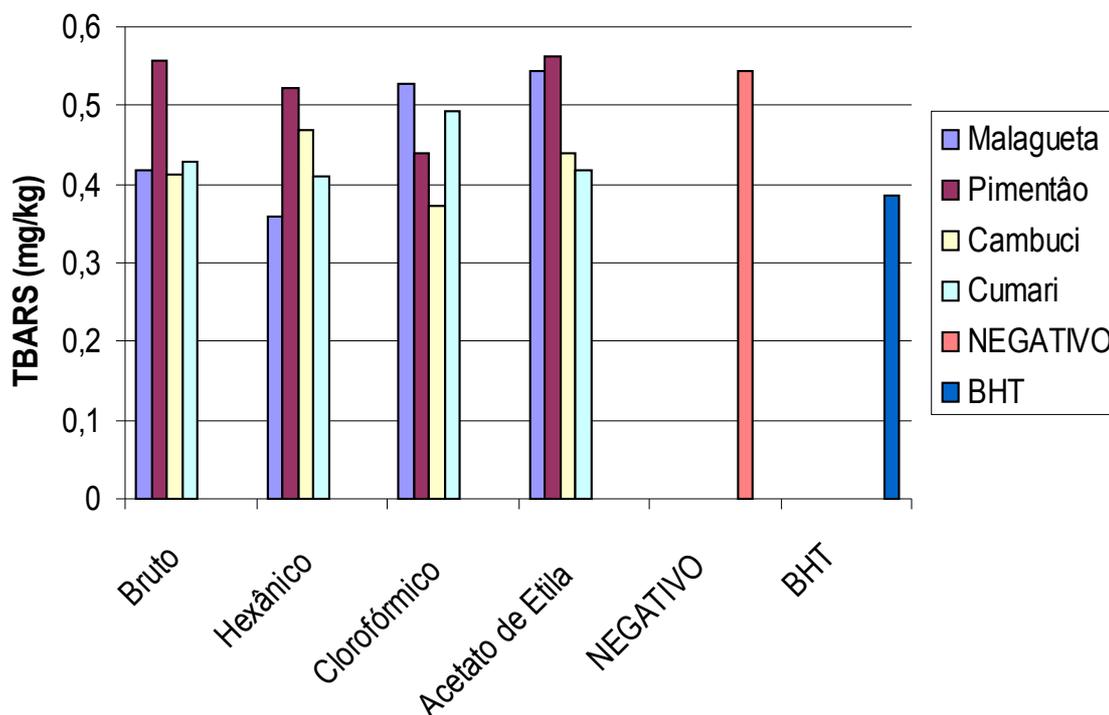


Figura 27 - Número de substâncias reativas ao ácido 2-Tiobarbitúrio(mg de malonaldeído por Kg de almôndegas), para o 21º dia de armazenamento, em função do extrato bruto e fracionado de pimentas *Capsicum*

A ação de um antioxidante no alimento depende de fatores como os tipos de radicais livres formados, onde e como são formados, a forma como é analisada e a metodologia utilizada, bem como as concentrações ideais para obter proteção (BIANCH & ANTUNES, 1999).

Assim, é possível que um antioxidante retarde ou acelere uma reação oxidativa. Segundo Araújo (2001), a diferença na estrutura molecular dos antioxidantes apresenta uma importante diferença em sua eficiência quando utilizados em diferentes tipos de óleos, alimentos e sob diferentes condições de processamento e manuseio. Também existe a preocupação de como os antioxidante irão funcionar na presença de pró-oxidantes e na presença de outros antioxidantes presentes no alimento ou formados durante o processamento.

Conforme Zheng et al. (2001), é difícil comparar e caracterizar as atividades antioxidantes dos extratos, devido à diversidade e complexidade das misturas naturais de compostos fenólicos presentes.

O Sistema β Caroteno/Ácido Linoleico avalia a capacidade que o antioxidante possui

em proteger o ácido linoleico e o β Caroteno da oxidação, identificando substâncias pró-oxidantes como a vitamina C.

O método DPPH consiste em avaliar o poder doador de elétrons para o radical DPPH que o antioxidante possui, detectando mais as frações polares que contêm mais compostos fenólicos, que por sua vez possuem maior poder doador do que outros compostos e não identifica substâncias pró-oxidantes.

Já a metodologia da quantificação de substâncias reativas ao TBA no alimento, ou seja, o número de malonaldeído formado pelo processo oxidativo, os resultados podem ser diferentes aos obtidos pelos métodos “*in vitro*”, pois várias interações podem ocorrer devido ao fato dos extratos estarem misturados a carne e outros ingredientes contidos nas almôndegas.

4.5. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações das quatro espécies de pimenta *Capsicum* (*C. baccatum* var. *prateatermissum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens*) foram testadas frente a 09 cepas bacterianas. Sendo cinco Gram-negativas e quatro Gram positivas. A escolha das cepas ocorreu por serem bactérias causadoras de Doenças de Origem Alimentar (DTA's) e/ou provocarem alterações organolépticas e nutricionais nos alimentos, diminuindo sua aceitabilidade e vida de prateleira.

Estão apresentados na Tabela 10 os valores da Concentração Inibitória Mínima (**CIM**) e Concentração Letal Mínima (**CLM**) em mg/ml, do extrato bruto e fracionado da pimenta malagueta (*C. frutescens*), pimentão magali (*C. annuum* var. *annuum*), pimenta cambuci (*C. baccatum* var. *baccatum*.) e pimenta cumari (*C. baccatum* var. *praetermissum*).

O *Capsicum baccatum* var. *prateatermissum*, popularmente conhecida como cumari, espécie esta extremamente pungente apresentou efeito antibacteriano apenas para as frações acetato de etila e clorofórmio, com CIM de 1,25 mg/ml frente a *L. monocytogenes*. Sendo que ambas as frações foram as únicas que apresentaram efeito bactericida frente à mesma bactéria.

A *L. monocytogenes* é uma bactéria de grande preocupação para indústria de alimentos, pois segundo Germano & Germano (2001), uma bactéria que apresenta capacidade de resistir a sucessivos congelamentos e descongelamentos, podendo causar desde sintomas semelhantes à gripe até meningoencefalia, pneumonia, endocardites e até a morte, em 30% dos casos (SILVA JR., 2005).

Tabela 10 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) em mg/ml, de extrato bruto e fracionado da pimenta *C. baccatum* var. *prateatermissum* (cumari)

Microorganismos	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima (mg/ml)			
	Extrato Bruto (EB)	Fração Hexânica (FH)	Fração Clorofórmica (FC)	Fração Acetato de Etila (FA)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	10CIM
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	20CIM	5CIM
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	20CIM
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	20CIM	20CIM
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	1,25CIM/5CLM	1,25CIM/1,5CLM
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	20CIM	20CIM
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-

(-)Não detectado.

Ao se comparar as frações da pimenta cumari, observou-se que a (FA) foi a mais efetiva, com atividade frente a seis cepas bacterianas, seguido da fração clorofórmica frente a cinco cepas bacterianas. O extrato bruto e fração hexânica não apresentaram efeito antibacteriano. Acredita-se que este efeito presente nas frações mais polares (clorofórmica e acetato de etila), é decorrente da presença de capsaicinóides (560,80 e 515,24 mg/100 g respectivamente) e fenólicos totais (16.867,65 e 16.975,41 mg/100 g respectivamente), que foram maiores do que os encontrados no extrato bruto e hexânico: capsaicinóides (10,58 e 9,05 mg/100 g respectivamente) e fenólicos totais (177,63 e 126,65 mg/100 g, respectivamente).

Observou-se também que a pimenta cumari não apresentou efeito antibacteriano frente a *S. dysenteriae*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*.

Observa-se na Tabela 11, que a pimenta cambuci, *Capsicum baccatum* var. *pendulum* apresentou atividade bactericida frente *S. typhimurium*, *C. perfringens* e *L. monocytogenes*, sendo a FA a mais efetiva, com MIC e MLC de 5mg/mL frente a *S. typhimurium*.

Pode-se observar que todos o EB e as frações da pimenta cambuci foram efetivas para *S. typhimurium*. Um resultado bastante interessante, pois segundo RUCHERT et al. (2006) atualmente a *Salmonella* é o microorganismo mais relacionado a contaminações oriundas de alimentos que utilizam o frango como base. É de grande importância em saúde pública, por ser patogênica ao ser humano e por ser indicador reconhecido mundialmente para

detecção de contaminantes em alimentos.

Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado da pimenta *C. baccatum* var. *pendulum* (cambuci)

Microorganismos	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima (mg/ml)			
	Extrato Bruto (EB)	Fração Hexânica (FH)	Fração Clorofórmica (FC)	Fração Acetato de Etila (FA)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	20CIM
<i>Salmonella typhimurium</i>	10CIM/CLM	20CIM	10CIM/CLM	5CIM/5CLM
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	20CIM/CLM	10CIM/CLM	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	20CIM/CLM	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-

(-) Não detectado

Comparando-se o EB e as frações da cambuci, observa-se que apesar da FH ter apresentado efeito sobre três cepas bacterianas (*L. monocytogenes*, *C. perfringens* e *S. typhimurium*), a FA obteve o melhor desempenho, com a menor CLM (5 mg/ml) frente a *S. typhimurium*, enquanto que a menos efetiva foi a FC (CIM e CLM frente a apenas uma bactéria). As frações acetato de etila e clorofórmica apresentaram efeitos diferentes, mesmo com concentrações iguais de capsaicinóides e fenólicos totais, porém superiores quando comparados ao extrato bruto e fração hexânica. Tais resultados podem ser explicados pela menor ou maior sensibilidade de cada bactéria aos compostos variados extraídos por cada solvente ou sinergismo dos compostos.

As bactérias, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* não apresentaram sensibilidade ao extrato e frações da espécie *C. baccatum* var. *pendulum*.

Na Tabela 12 pode-se observar que a espécie *Capsicum annuum* var. *annuum* (pimentão magali) apresentou apenas atividade bacteriostática, sendo que a FC obteve maior efeito, pois foi efetiva contra quatro cepas com os menores valores de CIM, sendo a *Yersinia enterocolitica* a mais sensível. Uma bactéria psicotrófica capaz de crescer sob condições de refrigeração, produtora de enterotoxina termoestável, que causa diarreia, adenite mesentérica, além de manifestações extra-intestinais (cutânea, oculares), encontrada em vários alimentos como o leite, carne e derivados, bem como em vegetais (SILVA JR., 2005).

Tabela 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado da pimenta *C. annuum* var. *annuum* (pimentão magali)

Microorganismos	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima (mg/ml)			
	Extrato Bruto (EB)	Fração Hexânica (FH)	Fração Clorofórmica (FC)	Fração Acetato de Etila (FA)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	20CIM	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	20CIM	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	5CIM	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10CIM	10CIM	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	10CIM	2,5CIM	10CIM
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	5CIM	-

(-) Não detectado

O extrato bruto do pimentão não apresentou atividade antibacteriana e a FA foi efetiva apenas contra uma bactéria. Acredita-se que neste caso a atividade antibacteriana desta espécie esta relacionada a presença de outros compostos com esta atividade, já que o extrato bruto e as frações do pimentão apresentaram baixas concentrações de capsaicinóides e fenólicos totais. A fração clorofórmica foi a que apresentou melhor efeito bacteriostático.

Segundo Acero-Ortega et al. (2005), o efeito antimicrobiano do *C. annuum* pode estar relacionado à presença de ácidos lipofílicos como *t*-cinâmico, *o*-cumárico, *m*-cumárico e ácido cafeico, o que confirma maior atividade na FH e FC que extraem estes tipos de compostos.

Careaga et al. (2003) obtiveram com extrato isopropanólico de *C. annuum* (pimenta sino), CIM 1,5 mL/100 g na carne frente *Salmonella typhimurim*, e CIM de 3 ml do extrato/100g da carne de frente a *Pseudomonas aeruginosa*. E diferentemente do trabalho escrito por este autor, na presente pesquisa a fração com maior ação foi a que apresentava menor polaridade (FH) frente a *S. typhimurium*. Esta diferença de resultados pode ocorrer visto que o trabalho foi realizado *in vitro*.

Para a pimenta malagueta (Tabela 13) os melhores resultados foram obtidos com a FH, com CIM de 5mg/ml frente *C. perfringens* e 10mg/ml para *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*.

Tabela 13 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml de extrato bruto e fracionado

da pimenta *C. frutescens* (malagueta)

Microorganismos	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Letal Mínima (mg/ml)			
	Extrato Bruto	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato de Etila
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	10CIM	10CIM	10CIM	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	5CIM	5CIM	-	20CIM
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	10CIM	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	10CIM	10CIM	10CIM
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-

(-) Não detectado

Das nove bactérias testadas apenas quatro apresentaram-se sensíveis, e a pimenta malagueta só demonstrou atividade bacteriostática.

Carvalho et al. (2005) através do método de IINB (Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana) e IINAB (Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana), obtiveram efeito bacteriostático do extrato bruto a 50% frente a *E. coli*, na concentração de 10^7 UFC/ml. Este resultado não foi observado no presente trabalho, visto que *E. coli* não apresentou nenhuma sensibilidade.

Os resultados demonstram que as pimentas malagueta, cambuci e pimentão magali, obtiveram uma fraca ação inibitória do crescimento bacteriano, com CIM variando de 1,25 a 20 mg/mL. Apresentando ação moderada apenas a FA e FC da pimenta cumari frente a *L. monocytogenes*, com CIM de 1,25 mg/ml. Pois segundo Aligiannis et al. (2001), Concentração Inibitória Mínima com valores entre 0,6 e 1,5 mg/ml apresentam ação moderada e acima de 1,5 mg/ml uma fraca ação antimicrobiana.

Podemos observar que a espécie *C. baccatum* var. *prateatermissum* (cumari), a mais pungente das espécies e com maior concentração de capsaicinóides, seguida da pimenta *C. baccatum* var. *pendulum* (cambuci), apresentaram ação bactericida, e o *C. annuum* var. *annuum* (pimentão) e *C. frutescens* (malagueta) apresentaram apenas atividade bacteriostática, com menores concentrações de capsaicinóides.

A Concentração Inibitória Mínima do Clorofenicol foi de 0,0135 mg/ml para *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica* e *P. aeruginosa*, enquanto as demais cepas apresentaram CIM de 0,007 mg/ml. O clorofenicol não apresentou CLM pois segundo Levinson & Jawetz (2005), é antibiótico bacteriostático pois inibe a síntese de proteína, ficando as bactérias

incapazes de crescer.

A sensibilidade das bactérias testadas frente as pimentas segue a seguinte ordem: cumari = cambuci > pimentão > malagueta, pois a pimenta cumari apresentou CIM para seis bactérias e a menor CLM para o *L. monocytogenes*. A pimenta cambuci obteve CIM para quatro cepas e CLM para três bactérias, enquanto que o pimentão apresentou apenas CIM para seis bactérias e a malagueta para quatro.

Observa-se que para as quatro pimentas estudadas, o extrato bruto não apresentou inibição satisfatória perante as demais, porém, o extrato acetato de etila e clorofórmico foram os extratores que obtiveram os menores valores de CLM. Já o extrato hexânico apresentou ação bacteriostática. Tais resultados podem ser explicados em virtude do fracionamento ser seletivo e apresentar maior concentração de grupos químicos com possível ação antimicrobiana.

Extratos altamente polares como etanólico e metanólico extraem heterosídeos em geral, praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%. Solventes polares como acetato de etila extrai da planta substâncias como flavonóides, alcalóides, cumarinas simples e outros. O clorofórmio extrai compostos de baixa polaridade e pouco hidrofílicos como bases livres de alcalóides, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos (SIMÕES et al., 2001). Solventes apolares como o hexano extraírem compostos altamente lipofílicos como lipídios, ceras, pigmentos, furanocumarinas, serquiterpenos e terpenóides (SIMÕES et al., 2001; CARVALHO & CARVALHO, 2001).

No caso dos capsaicinóides substâncias específicas de pimentas do gênero *Capsicum*, por ser um composto aromático com uma longa cadeia de carbono, podendo assim ser extraídos parte em solventes polares como acetato de etila e clorofórmico, bem como em solventes apolares como hexano.

O *C. annuum* apresenta 0,174% de capsaicina (SIQUEIRA et al., 1988), *C. Frutescens* 0,89% de capsaicinóides e o *C. baccatum* (cambuci) 0% de capsaicinóides (REIFSCHNEIDER, 2000).

Segundo Perucka et al. (2000), a concentração dos capsaicinóides em espécies de pimentas mais quentes ou picantes, varia de 0,5 a 0,3% e para pimentões doces contêm de 0,0003 a 0,01%.

Para Domingo & Lopes-Brea (2003), a toxicidade dos compostos fenólicos frente aos microrganismos, estão diretamente relacionados ao local e número de grupos hidroxilas (OH)

presentes no anel aromático, de forma que quanto maior a hidroxilação maior será toxicidade. O mecanismo parece estar relacionado com a inibição enzimática por compostos oxidados, possivelmente relacionados aos grupos sulfídricos e por interações específicas com as proteínas.

Pode-se observar também que as bactérias Gram Negativas apresentaram maior sensibilidade aos extratos de pimentas do gênero *Capsicum* do que as Gram Positivas. Havendo grande variação de intensidade de ação entre as frações polares e apolares.

Os antibióticos podem inibir síntese de mucopeptídeo que provocando problemas na formação da parede celular, ruptura e destruição da célula microbiana, antimicrobianos bactericida causam este tipo de dano a célula (MURRAY et al., 2004). Com a destruição da célula bacteriana o conteúdo intracelular poderá ser liberado para o exterior, ou dependendo das alterações da integridade da membrana, íons, moléculas pequenas ou macromoléculas podem entrar na célula e prejudicar o seu metabolismo (ALTERTHUN, 2005).

5. CONCLUSÕES

Em virtude dos resultados apresentados neste trabalho conclui-se que:

- Os solventes polares (acetato de etila e clorofórmio) foram os mais eficientes para extração de capsaicinóides e fenólicos totais. Sendo a cumari, com maior pungência, a pimenta que obteve a maior concentração de Capsaicinóides e Fenólicos Totais;
- Através do Sistema β -caroteno/ácido linoléico o extrato bruto e fração acetato de etila foram os que atingiram a maior de atividade antioxidante;
- Pelo método DPPH, o maior poder doador de elétrons foi apresentado pelas frações polares, acetato de etila e clorofórmico. Com as maiores concentrações apresentando os melhores resultados.
- A atividade antioxidante pelo método TBARS apresentou variação entre os extratos e frações em função do tipo de pimenta, apresentando o melhor resultado a FH da malagueta seguida da FC da cambuci, EB da malagueta e cambuci e FA e FH da cumari, todos com valores estatisticamente iguais ao BHT.
- A ação bactericida foi obtida pelas frações acetato de etila e clorofórmica, ficando a fração hexânica com apenas ação bacteriostática e o extrato bruto não apresentou inibição satisfatória.
- O *C. baccatun* var. *praetermissum* (cumari), *C. baccatun* var. *pendulum* (cambuci) e *C. frutescens* (malagueta) podem ser utilizados como agentes antioxidantes e conservantes em alimentos, apresentando-se como uma alternativa natural na garantia da qualidade do produto final. Já *C. annuum* var. *annuum* (pimentão magali) obteve um bom desempenho apenas em concentrações elevadas das frações polares pelo método DPPH.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERO-ORTEGA, C.; DORANTES, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; TAPIA, M. S.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.; ALZAMORA, S.; LÓPEZ-MALO, A. Response surface analysis of the effects of *Capsicum* extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Engineering**, v.67, p.247-252, 2005.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, p.4168-4170, 2001.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação de antibacterianos e mecanismo de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.79-84.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 416p.
- ARAÚJO, W. M. C. Alimentos, Nutrição, Gastronomia & Qualidade de Vida. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 80, 146 p., 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed. International Arlington, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 14.ed. Washington, D. C. 1980.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, n.1, p.27-36, 2005.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTTEDAELE, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLI, G. V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *S. multicaulis* (Vahl.). **Food Chemistry**, v.84: p.519-525, 2004.
- BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. Edible oil and fat products: oils and oilseeds. New York, v.2, 1996. 403p.
- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacologia**, João Pessoa-PB, v.7/8, n. 21, p. 22-34, 1997/98.
- BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius Raddi*)**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutri.**, Campinas, v.12, n. 2, p.123-130, maio/ago., 1999.

BORGET, M. **Spice plants**. Landon, 114p.1993.

BOSLAND, P. W. Breeding for quality in *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 12, p. 25-31, 1993.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**,v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria n.574 de 8 de dezembro de 1998. **Diário Oficial da União**. Brasília, 31 de julho de 2000.

CALIFANO, A. N.; DE ANTONI, L.; MASCHERONI, R. H. Prevalence of unsafe practices during home preparation of food in Argentina. **Dairy Food and Environ. Sanitation**, v.20, n.12, p.12-17, 2000.

CAREAGA, M.; FERNANDEZ, E., DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; HERNANDEZ, SANCHEZ H. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **Int J Food Microbiol**, v.83, n.3, p. 331-335, jun. 2003.

CARVALHO, G. J. A.; CARVALHO, M. E. Diterpenos, triterpenos e esteroides das flores da *Wedelia paludosa*. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.24-26, 2001.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Ver. Brás. Pl. Méd.**, Botucatu, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos alimentos. **LOGOS**, n.12, p.57-69, 2005. Disponível em: feucriopardo.edu.br/logos/artigos/artigo6_2005.polf. Acesso em 12/06/2007.

CARVALHO, S. I. C. DE; BIANCHETTI, L. DE B. **Sistema de produção de pimentas**, Dez.2004. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>. Acesso em: 01/02/2006.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CICHEWICZ, R. H.; TRORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, p.61-70, 1996.

CINTRA, R. M. G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. **Nutrire**, v.22, p.49-62, 2001.

COUTINHO, H.; DOUGLAS, M.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade Antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, n.10, Jul. 2003 -Jun. 2004. Disponível em: <http://adufpb.org.br/publica/conceitos/>. Acesso em: 26/01/2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

- DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.**, v.5, p.165-180, 1987.
- DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.
- DEEPA, N.; KAUR, C.; GEORGE, B.; SINGH, B.; KAPOOR, H. C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT**, v.40, p.121-129, 2007.
- DJENANE, D.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; BELTRÁN, J. A. RONCALÉS, P. Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmospheres. **Food Chem.**, v.76, p.407-415, 2002.
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas com ação antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimioterap**, v.6, n.4, p.385-393, Dez., 2003.
- DORANTES, L.; COLMENERO, R.; HERNÁNDEZ, H.; MOTA, L.; JARAMILLO, M; FERNÁNDEZ, E.; SOLANO, C. Inhibition of growth of some food borne pathogenic bacterial by *Capsicum annuum* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p.125-128. 2000.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316. 2000.
- DORMAN, H. J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M. J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected mamiaceae herbs. **Food Chemistry**. v.83, n.2, p.255-262, 2003.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais livres. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- FLAGAN, S. F.; LEADBETTER, J. R. Utilization of capsaicina and vanillylamina as growth substrates by *Capsicum* (hot pepper)-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 1-6, 2005.
- FERRÃO, J. E. M. **Especiarias: Cultura Tecnologia Comércio**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1993. 413p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 56p.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.**, v.43, p.228-265, 2004.
- GAZI,M.R; KATO,k.. Optimisation of Various cultura condicions on Growth and Antioxiandant Activity Generation by *Saccharomyces cerevisie* IFO 2313. **Journal of Biological Sciences**, p.224-228,2004.

GERMANO, M. I. S. **Promoção a saúde:** desafio para os profissionais envolvidos no treinamento de manipuladores de alimentos. 2002. 132f. (Tese Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública da USP, 2002.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos. Qualidade das matérias primas. Doenças transmitidas por alimentos:** treinamento de recursos humanos. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

GHELARDI, E; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 129-134, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMÉZ, M. E. D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta.** 2003. 149f. (Tese para obtenção de grau de Doutor) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GOVINDARAJAN, V. S.; Capsicum-Production, technology, chemistry, and quality – Part II. Processed products, standards, world production and trade. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, India, v.23, p.207-288, 1986.

GOVINDARAJAN, V. S.;RAJALAKSHMI, D.; CHAND, N. Capsicum-Production, technology, chemistry, and quality – Part IV. Evaluation of quality. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, India, v.25, p.285-282, 1987.

GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, n.1, Campinas, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000100008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 11 Ago. 2007.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROMA, O. I.; The characterization of Antioxidants. **Food Chem. Toxic.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry.** 3.ed. Londres: Academic, 1988.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.2928-2935, 2005.

HEFNAWY, Y. A.; MOUSTAFA, S. I.; MARTH, E. H. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 10, p. 876-878, Oct., 1993.

HERNADEZ VELASCO, X.; VICENTE SALVADOR, J. L.; LÓPEZ COELHO, C.;

HARGIS, B. M. Efecto de la adición del ácido cápsico, proveniente de la semilla de paprika (*Capsicum annum*) en la dieta de pollo de engorda infectado experimentalmente por *Salmonella gallinarum* infection in broiler chicks. **Vet. Méx**, v. 27, n.4, p. 13-309, oct., 1996.

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

HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry. In: Eastern Nutrition Conference, 2003, Quebec City. **Anais**. Quebec City: UON, 2003, p.1-23.

JANCSO, N.; JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 31, p.138-142, 1967.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

JÔ, C.; AHN, D. U. Fluorometric analysis of 2-Thiobarbituric acid reactive substances in Turkey. Ames, Iowa. **Poultry Science**, v.77, p.475-480, 1998.

KALEMBA, D.; KUNIKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, n.7, p.703-725, 2001.

KIM, J. M. et al. Antibacterial activity of carvacrol, cintral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fresh cubes. **J. Food Sci.**, v.60, n.6, p.1364-1368, 1995.

KIRSCHBAUM-TITZE, P.; HIEPLER, C.; MULLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annum*). Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.1260-1263, Feb. 2002.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiol**, v.125, p.58-60, 2001.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIMA, A. W.O.; SOUSA, C. P. Infecções e intoxicações alimentares. In: **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos**. 1 ed. João Pessoa, PB: Nova Idéia, 2002, v. 1, p. 175-199.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v.92, n.2, p.201-208, 2004.

MANZANILLO, E. G.; BAUCCELLS, F.; KAMEL, C.; MORALES, J.; PEREZ, J. F.; GASA, J. Effects of plant extracts on the performance and lower gut microflora of early weaned piglets. **J. Anim. Sci.**, v.79, Suppl. 1, p473, 2001.

MARCO, G. J. A rapid method for evolution of antioxidants. **Journal of the American Oil**

Chemists' Society, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARIN, A.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I. Characterization and quantification of antioxidant constituents of sweet (*Capsicum annuum* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3861-3869, 2004.

MARKUS, F.; DAOOD, H. G.; KAPITANY, J.; BIACS, P. A. Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. **J. agric. Food Chem.**, v.47, p.100-107, 1999.

MARTÍNEZ, L.; CILLA, I.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Effect of *Capsicum annuum* (Red sweet and cayenne) and *Piper nigrum* (black and white) pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. **J. of Food Science.**, v.71, n.1, p.48-53, 2006.

MARTINS, E.R; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. **Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG:UFV, 2003. 220p.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.1750-1756, 2005.

MATSUFUJI, H.; NAKAMURA, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Antioxidant activity of capsanthin and fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). **J. Agric. Food Chem.** v.46, p.3468-3472, 1998.

MELO, R. C. de A. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 2, p.193 – abril 2005. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br>. Acesso em: 20/01/2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research.**, v.15, p.127-130, 2001.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 3.ed. São Paulo: Tecmed, 2004.

MILTENBURG, G.; BRUGALLI, I. Alimentação Alternativa: A utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e do desempenho animal. In: Simpósio sobre Nutrição de Aves e Suínos, 2., 2004, Cascavel. **Anais...**Cascavel: CBNA, 2004. p. 119-134.

MINNARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells. **J Food Protec**, v.64, n.10, p.1535-1541.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHAVEZ, E. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **J. of Ethnopharmacology**, v.64, p.241-248, 1999.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for

- estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.
- MORAIS, H.; RODRIGUES, P.; RAMOS, C.; ALMEIDA, V.; FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T.; OLIVEIRA, J. S. Effects of blanching and frozen storage on the stability of β -carotene and capsanthin in red pepper (*Capsicum annuum*) fruit. **Food Sci Technol**, v.8, p.55-59, 2002.
- MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Ver. Nutr**, Campinas, v.15, n.2, p.1-14. 2002.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762p.
- OBOH, G.; PUNTEL, R. L.; ROCHA, J. B. T. Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum chinense*, Habanero) prevents Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in brain – *in vitro*. **Food Chemistry**, v.102, n.1, p.178-185, 2001.
- OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carne e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova.**, Campinas, v. 28, n. 4, 2005 . Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 12 Ago., 2007.
- PANETTA, J. C.; TELLES RAMOS, E.O.; VILLARREAL, L. Y. B.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S. FERREIRA, A. J. P. Isolamento e identificação de *Bacillus spp* de leite UHT: detecção de toxina. **Higiene Alimentar**, v.20, n.142, p.72-78, 2006.
- PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes* –threat to a safe food supply: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p.912-928, 1990.
- 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**, v.71, p.287-291, 2000.
- PICKERSGILL, B. The domestication of chili peppers. **The domestication and exploration of plants and animals**. Landon: Gerald Duckworth, 1969. p.443-50.
- PINEDA-CISNEROS, O.; TORRES-TAPIA, L. W.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L. C.; CONTRERAS-MARTÍNS, F.; GONZÁLES-ESTRADA, T. PERAZA-SÁNCHEZ, S. R. Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, México. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1755-1760, 2007.
- PINO, J.; GONZÁLEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURIÓN-YAH, A. R.; TRUJILLO-AGUIRRE, J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack) cultivars grown in Yucatan. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p.1682-1686, 2007.
- PURKISS, J. WELCH, M. DOWARD, S. FOSTER, K. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons:involvement of two distinct mechanisms. **Biochem Pharmacol**, v.59, p.1403-1406, 2000.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacognosia**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692p.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, n.11, p.2182-2185, 1992.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org.) **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa Hortaliças, 2000. 113p.

RENZ, S. V.; **Oxidação e Antioxidantes**. 2003. 11p. Disponível em: http://www.6ufrgs.br/bioquímica/posgrad/BTA/oxid_antiox.pdf. Acesso em: 07/06/2006.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Mol. Biol.**, v.24, n.1, p.1-20, 1994.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.23, p.127-149, 1988.

RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. dos S.; GELLI, D. S. O efeito da pimenta do reino moída frente a contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubslaw. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 62, n.2, p. 131-133, 2002.

ROGINSKY, V. LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food **Food Chem.**, v.92, p.235-254, 2005.

ROSA, A.; DEIANA, M.; CSU, V.; PACCAGNINI, S.; APPENDIDO, G.; BALLERO, M.; DESSI, A. Antioxidant Activity of Capsinoids. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n.25, p. 7396-7401, 2002.

RUCHERT, D.A. S. V.; PINTO, P.S. A.; RODRIGUE, A. C. A.; BEVILACQUA, P. D.; BRAGA, M. D.; PINTO, M. S. Métodos de pesquisa de *Salmonella sp* durante o abate de frangos. **Higiene Alimentar**, v.20, n.146, p.49-54, 2006.

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

SALAZAR-OLIVO, L. A.; SILVA-ORTEGA, C. O. Efectos farmacológicos de capsaicina, el principio pungente del chile. **Biologia Scripta**, v.1, n.1, p.7-14, 2004.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, p.333-364, 2001.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHULZA, D.; BATISTAD, C. R. V. Avaliação microbiológica de sanduíches intactos excedentes de vôs do aeroporto internacional Hercílio Luz, de Florianópolis, SC. **Higiene Alimentar**, v.20, n.147, p.66-72, 2006.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC**

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHYMALA, B.N.; GUPTA,S; LAKSHMI,A.J.; PRAKASH, J. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p.239-245, 2005.

SILVA JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentos**. 6.ed., 2005, 623p.

SILVA, C. H. P. de M. **Bacteriologia, um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Staphylococcus sp coagulase-positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n.122, p.32-40, 2004.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Santa Catarina: UFSC, 2001.

SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; ENE, L.; CHAVES, C.; ALICE, C.B; SILVA, G.A.A.B. Capsaicinóides em *Capsicum annuum* L. e *Capsicum frutescens* L. E avaliação do teor em capsaicina em *Capsicum annuum* L., do Rio Grande do Sul. **Ver. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v.10, p. 101-106, 1988.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidante. **Ver. Nut.** v. 15, n.1 Campinas, 2002.

SOKMEN, A.; GULLUCE, M.; AKPULAT, A.; DAFERERA, D. TEPE, B.; POLISSION, M.; SOKMEN, M.; SAHIN, F. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius. **Food Chemistry**, n.15, p.627-634, 2004.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, S. D.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: Utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **APS - Atenção Primária a Saúde**, Juiz de Fora, v.9, n.1, jan./jun., p.1-11, 2006.

ST. ANGELO, A. J. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.3, p.175-224, 1996.

SUM, J. et al Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p.7449-7454, 2002.

- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomed. Pharmacotherapy**, v.58, p.100-110, 2004.
- TARLADGIS, B.G.; PEARSON, A.M.; DUGAN, J.L.R. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. **Journal Science Food Agriculture**, Champaign, v.15, n.9, p.602-607, 1964.
- TEGOS, G; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O. Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3133-3141, 2002.
- TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE, L. C. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: Arned, 2000.
- TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Assessment of carotenoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum L.*) grown in Turkey. **J. of Food Composition and Analysis**, v.20, n.7, p.596-602, 2007.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- VAIJAYANTHIMALA, J.; ANANDI, C.; UDHAYA, V.; PUGALENDI, K. V. Anticandidal activity of certain south Indian medicinal plants. **Phytotherapy Research**, India, v. 14, p.207-209, 2000.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem.**, v.266, p.37-56, 2004.
- WAGNER, C. M. **Variedade e base genética da pungência e da caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum L.*** 2003.104p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERRUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**. v.88, p.293-297, 2004.
- WEINGOLD, S. E.; GUZEWICH, J.; FUNDALA, J. K. Use of foodborne disease data for HACCP risk assessment. **J. Food Protect**, v. 57, n.9, p. 820-830, 1994.
- WINK, M. Special Nitrogen Metabolism. In: DEY, P.; HARBORNE, J. B. (Org.) **Plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. cap. 12, p. 438-486.
- YOUNG, A.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.385, p.20-27, 2001.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. Staphylococcus aureus in raw milk and human health risk. **Bulletin IDF**, v.345, p.15-18, 2000.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.11, p.5165-5170, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)