



**Composição química e atividade antioxidante de
diferentes variedades de pimento (*Capsicum annum* L.)**

Lília Nogueira

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

**Doutor Alfredo Augusto Carvalho Aires
Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira
Bragança**

2013

À família
Aos amigos

AGRADECIMENTOS

De modo particular gostaria de agradecer ao Doutor Alfredo Aires pela orientação, disponibilidade e sobretudo pela ajuda prestada para a concretização deste trabalho, assim como pela transmissão dos seus conhecimentos científicos, opiniões e sugestões.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira por me ter dado esta oportunidade para realizar o meu trabalho sob sua orientação. Quero agradecer todo o apoio, simpatia e incentivo prestado. Muito Obrigada.

A toda equipa do edifício das Ciências Agrárias, nomeadamente à D. Rosa pela simpatia, bom acolhimento e disponibilidade.

Endereço ainda os meus agradecimentos a toda a equipa de docentes por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do Mestrado, que me proporcionaram a melhor formação possível.

A todos os meus amigos que me acompanharam, em especial à Tina pela amizade partilhada, pelo apoio nos momentos de maior desânimo e pelo seu companheirismo.

À Sandra, à Isa, ao João, à Joana, à Carolina, à Ângela e ao Vinhais pela amizade partilhada ao longo da nossa vida académica, foi com eles que me diverti. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!

O maior agradecimento é dirigido à minha família. Aos meus pais, ao meu irmão e á minha cunhada Filipa pelo apoio incondicional, compreensão, incentivo e motivação.

Obrigada !!

RESUMO

Existe uma preocupação crescente sobre o consumo de produtos alimentares de elevada qualidade, com possibilidade de contribuir para a diminuição do envelhecimento precoce, reduzir processos inflamatórios e evitar o aparecimento de doenças degenerativas. Exemplos de compostos associados a estas propriedades são os compostos fenólicos, carotenóides, fitosteróis, ácidos orgânicos e saponinas, entre outros. A informação sobre estes compostos, em alguns tipos de produtos alimentares, é ainda escasso, particularmente em Portugal em que a maioria dos estudos são feitos apenas para a composição química. Neste contexto, devido à informação científica limitada sobre o interesse biológico dos pimentos para a saúde humana, apresentamos este estudo, em que queremos demonstrar o alto valor biológico de diferentes cultivares de pimentos com relevância económica em Portugal. A partir de diferentes pimentos seleccionados (*Capsicum annuum* L.) (pimento amarelo, pimento vermelho, pimento vermelho italiano, pimento verde, pimento verde italiano, pimento verde padrão e piri-piri) procedeu-se á avaliação da composição química (vitamina C, carotenóides e clorofilas, compostos fenólicos e flavonóides, fenólicos e capsaicinóides individuais) e potencial antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS, poder redutor, emulsão do β -caroteno/ácido linoleico, aprisionamento de radicais hidroxilo e da quelatização de metais, relacionando a eficiência dos solventes de extração, hexano, acetato de etilo, metanol 100 % e metanol 80 % nos métodos aplicados. Os métodos espectrofotométricos e CLAE-UV/DAD foram usados para medir essas propriedades. Foi também avaliada a provável relação entre esta actividade biológica e os teores médios dos diferentes compostos bioactivos. Os resultados obtidos mostraram que o índice médio de compostos bioativos e atividade antioxidante eram dependentes de solvente de extração utilizado. Entre os diferentes cultivares, o pimento verde e pimento verde padrão foram aqueles com o teor mais elevado de vitamina C, β -caroteno clorofila b, ácido gálico e quercetina. Estas cultivares apresentaram, em geral, a actividade antioxidante mais elevada, o que parece estar relacionada com os seus níveis mais elevados de compostos bioactivos. Com base nos resultados obtidos conclui-se que o pimento produzido em Portugal é uma importante fonte de natural de compostos antioxidantes.

Palavra-chave: *Capsicum annuum*, compostos bioactivos, actividade antioxidante, potencial biológico.

ABSTRACT

There is a growing concern on consumption of high nutritional quality food that is capable of decreasing premature aging, reducing inflammatory processes and preventing the emergence of degenerative diseases. Phenolic compounds, carotenoids, phytosterols, organic acids and saponins, among others, are frequently associated with these kinds of benefits. Regardless the diversity of studies on the biological role of bioactive compounds, the information on these compounds in some types of food products is still scarce, particularly in Portugal, in which the majority of studies are dedicated only to chemical composition. In this context, due to the limited scientific information on the biological interest of pepper to human health, we present this study, in which we want to demonstrate the high biological value of different cultivars of peppers with economical relevance in Portugal. From selected different peppers (*Capsicum annuum* L.) cultivars (yellow-pepper, red-pepper, Italian sweet-pepper, green-pepper, green-pepper padrão and chilli) we evaluate first their chemical composition (vitamin C, carotenoids and chlorophylls), secondly their phytochemical composition (phenolics and flavonoids, phenolic and individual capsaicinoids) and third and last their antioxidant activity by the methods of DPPH, ABTS, reducing power, β -carotene/linoleic acid bleaching assay, hydroxyl radical and chelating metal assay. Spectrophotometric methods and HPLC-UV/DAD were used to measure these properties. Our results showed that average content of bioactive compounds and antioxidant activity, were dependent of extraction solvent used. Also, the results showed that in general all peppers are rich source of antioxidant compounds, particularly phenolic acids, flavonoids and carotenoids. Nonetheless this richness can be affected by the extraction method which interfere with their average levels. Among the different cultivars studied, green-pepper and green-pepper padrão were those with the highest content of vitamin C, β -carotene, chlorophyll b, gallic acid and quercetin. Also, these cultivars exhibited, in general, the highest antioxidant activity, which seems to be related with their higher levels of bioactive compounds. Based on our results, the peppers produced in Portugal have high biological value for human health and can be an easy source of natural antioxidants. Thus, their consumption must be incremented on a healthy diet basis.

Keywords: *Capsicum annuum* L, bioactive compounds, antioxidant activity, biological potential.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. O pimento (<i>Capsicum annuum</i> L. e <i>Capsicum frutescens</i> L.).....	4
3.1.1. Caracterização e centro de origem.....	4
3.1.2. O pimento no contexto da produção hortícola nacional e internacional.....	8
3.1.3. O valor alimentar do pimento	10
3.2. Os compostos bioativos.....	12
3.3. Propriedades biológicas dos compostos bioativos	16
3.4. Fatores que influenciam a disponibilidade dos compostos bioativos	18
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Amostras vegetais	20
4.1.1. Preparação das amostras	20
4.1.2- Preparação de Extratos	21
4.2. Determinação do teor médio em fenóis totais (capacidade redutora total) e flavonoides totais	21
4.3. Determinação de teor médio em clorofila a, clorofila b e carotenoides totais	22
4.4. Determinação do teor médio de Vitamina C total.....	23
4.5. Determinação do teor médio em β – Caroteno por HPLC	24
4.6. Determinação do teor médio em fenólicos e flavonoides individuais por HPLC	24
4.7. Determinação do teor médio em capsaicinóides por HPLC	25

4.7.1. Determinação da pungência (Unidades de Scoville)	26
4.8. Atividade Antioxidante	26
4.8.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	26
4.8.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical livre ABTS +	27
4.8.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método da quelatização de metais	28
4.8.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor	29
4.8.5. Determinação da atividade antioxidante pelo método de descoloração do β -Caroteno/ácido linoleico	30
4.8.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método de aprisionamento de radicais hidroxilo.....	30
4.9. Análise estatística.....	31
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Caracterização Química	32
5.1.1. Teor em fenóis totais e flavonóides totais.	32
5.1.2. Carotenoides totais.....	39
5.1.3. Quantificação β - Caroteno	44
5.1.4. Capsaicinóides	47
5.1.5. Teor em vitamina C	49
5.2.- Atividade antioxidante	51
5.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres DPPH	51
5.2.2. Captura do radical livre ABTS +	53
5.2.3. Inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico	54
5.2.4. Aprisionamento de radicais hidroxilo.....	55
5.2.6. Efeito do poder redutor	57
5.3. Atividade antioxidante <i>versus</i> compostos bioativos.....	59
CAPITULO VI- CONCLUSÃO	64

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização botânica do género <i>Capsicum</i> : (1) <i>Capsicum annuum</i> , (1a) Fruto; (2) <i>Capsicum frutescens</i> , (2a) Flor, (2b) Fruto; (3) <i>Capsicum chinense</i> , (3a) fruto; (4) <i>Capsicum Pubescens</i> , (4a) Fruto.....	6
Figura 2. Evolução da área e produção do pimento em Portugal, entre 2001 e 2011... 9	9
Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides.	Erro! Marcador não definido.
Figura 4. Algumas das amostras preparadas para extração em Soxhlet (1-pimento amarelo; 2- Pimento vermelho; 3-Pimento verde-italiano; 4-Pimento vermelho-italiano; 5- pimento verde).....	21
Figura 5. Amostra de piri-iri nos diferentes solventes de extração, para posterior leitura espectrofotométrica e quantificação do teor em fenóis totais	33
Figura 6. Alguns dos extratos preparados para posterior leitura espectrofotométrica para quantificação de flavonóides totais.....	34
Figura 7. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 280 nm.....	37
Figura 8. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 320 nm.....	38
Figura 9. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 370 nm.....	38
Figura 10. Amostras dos diferentes pimentos em estudo, preparadas para posterior leitura espectrofotométrica, com os respetivos solventes de extração (1) Solventes hexano e acetato de etilo; (2) Solventes metanol 100% e metanol 80%.	39
Figura 11. Teor máximo de carotenoides totais expresso em $\mu\text{g/g}$ de peso seco para as amostras: (A) pimento verde padrão e (B) piri-iri. Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).	40
Figura 12. Teor de carotenoides totais expresso em $\mu\text{g/g}$ de peso seco para as amostras: (C) pimento amarelo e (D) verde-italiano. Valores expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).	41
Figura 13. Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco) de clorofila a, na amostra de piri-iri de acordo com o solvente de extração.....	44

Figura 14. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento amarelo obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.....	45
Figura 15. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento vermelho obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.	46
Figura 16. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento verde obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.....	46
Figura 17. Estrutura química dos principais alcalóides do fruto <i>Capsicum</i>	47
Figura 18. Perfil cromatográfico dos capsaicinóides, (1) capsaïcina e (2) dihidrocapsaicina na amostra piripiri, obtido por HPLC-UV-/DAD a 222 nm.....	48
Figura 19. Amostras preparadas previamente para leitura espectrofotométrica após a reação redox.....	50
Figura 20- Mistura resultante para posterior leitura espectrofotométrica para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	52
Figura 21. Extratos preparados para posterior leitura espectrofotométrica para determinação da atividade antioxidante pelo aprisionamento de radicais hidroxilo.....	55
Figura 22. Extratos obtidos antes da adição do cloreto de ferro (III)	58
Figura 23. Extratos obtidos após a adição de cloreto de ferro (III).....	58
Figura 24. Diagrama de componentes principais (PCA) da atividade antioxidante e compostos bioativos analisados nos diferentes extratos.....	60
Figura 25. Diagrama de componentes principais da actividade antioxidante e compostos bioactivos analisados nos diferentes extractos de acordo com os respectivos solventes de extracção.	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação botânica do pimento e do piri-piri.....	4
Tabela 2. A cultura do pimento no Mundo.....	8
Tabela 3. Composição média em micro e macronutrientes do fruto <i>Capsicum</i> . Valores expressos em unidades por 100g de parte comestível.	11
Tabela 4. Teores vitamínicos médios, do pimento verde e pimento maduro.....	11
Tabela 5. Composição média do pimento verde e pimento maduro.	12
Tabela 6. Material vegetal utilizado no estudo.	20
Tabela 7. Teor em fenóis totais nas diferentes variedades em estudo.....	33
Tabela 8. Resultados para a quantificação de flavonóides totais, presentes nas diferentes variedades de pimento em estudo.	35
Tabela 9. Fenólicos individuais identificados, expressos em $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco.....	36
Tabela 10. Resultados expresso em $\mu\text{g/. g} - 1$ peso seco, de clorofilas existentes nos pimentos em estudo de acordo com o solvente de extração.	43
Tabela 11. Concentração de β - caroteno nas amostras de pimento em estudo	44
Tabela 12. Resultado para a concentração de capsaïcina e dihidrocapsaicina, expressos em $\mu\text{g.g-1}$ de peso seco. Classificação da pungência do piri-piri em Unidades de calor Scoville.*	49
Tabela 13. Concentração de ácido ascórbico (mg.g^{-1} peso seco) nas diferentes amostras de pimentos.	50
Tabela 14. Resultados da atividade antioxidante (% AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração, através do efeito bloqueador de radicais livres DPPH.....	52
Tabela 15. Resultados da atividade antioxidante (% inibição) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração, através da captura do radical livre ABTS +.....	53
Tabela 16. Resultados relativos á atividade antioxidante (% inibição) dos diferentes pimentos em estudo em função, do solvente de extração através da inibição da oxidação lipídica.	54
Tabela 17. Resultados relativos á atividade antioxidante (%AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração através do aprisionamento dos radicais.....	56

Tabela 18. Resultados relativos á atividade antioxidante (% AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração pelo método de quelatização de metais..... 57

Tabela 19. - Resultados relativos à atividade antioxidante (mg de ácido ascórbico equivalente/g peso seco) dos diferentes pimentos em estudo em função, do solvente de extração através do poder redutor..... 59

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma crescente atenção sobre o papel da dieta na saúde humana. Numa dieta saudável e equilibrada, a fruta e os legumes são elementos importantes, na medida em que para além de fornecerem vitaminas, minerais, fibras, hidratos de carbono, são também fontes naturais de compostos bioativos. Estes compostos são assim designados, por estarem frequentemente associados a propriedades benéficas que as plantas podem ter na saúde humana, como seja a prevenção do envelhecimento precoce, de acidentes cardio-vasculares, da diabetes, e de doenças crónicas e degenerativas. Apesar do crescente interesse no consumo em vegetais, a realidade é que o consumo continua ainda a ser moderado relativamente a outros géneros alimentícios como a carne, o peixe ou o leite. Segundo WHO/FAO (2003), aproximadamente 16 milhões (1,0%) de mortes no mundo são atribuíveis ao consumo reduzido de frutas e legumes. Segundo estudos do The European Food Information Council (<http://www.eufic.org/article/pt/expid/Fruit-vegetable-consumption-Europe/>) revela que a população europeia em geral, consome em média 386 gramas de fruta e hortaliças por dia, enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, no mínimo, 400 gramas. A ingestão média atinge esta dose diária em apenas seis países da Europa: Alemanha, Áustria, Bélgica, Hungria, Itália e Polónia (WHO, 2009). Apesar destes valores médios serem baixos, constata-se no entanto uma maior preocupação por parte do consumidor em adquirir produtos naturais, pelo que os vegetais estão cada vez mais presentes na dieta alimentar de todo mundo e são uma excelente fonte de compostos bioactivos como sejam os compostos fenólicos, carotenóides, fitosteróis, ácidos orgânicos, saponinas, glucosinolatos entre muitos outros.

Plantas do género *Capsicum*, como o pimento-verde, pimento-vermelho, pimento-amarelo e outras, são culturas agrícolas importantes com um peso económico considerável. Por outro lado são vegetais importantes do ponto de vista nutricional uma vez que são fontes importantes de vitamina E, vitamina C, carotenoides, compostos fenólicos e capsaicinóides que são os responsáveis pelo sabor picante que algumas variedades apresentam. As diferentes cores dos pimentos podem ser devidas a diferentes composições químicas e sua concentração como um reflexo das diferenças genéticas e grau de maturação. As cores atrativas, variável entre o vermelho, verde passando pelo amarelo intenso, são o principal fator associado à decisão de compra do consumidor. Os carotenóides (capsantina e caroteno) e flavonóides são corantes vegetais importantes,

sendo responsáveis pelas cores laranja e vermelho que os frutos apresentam. O fruto imaturo apresenta cor verde que se caracteriza pelo elevado teor em clorofila e carotenóides típicos do cloroplasto. As cores amarelas, laranja e vermelha resultam da presença de vários compostos entre os quais α - e β -caroteno, zeaxantina, luteína e β -criptoxantina capsantina, capsorubina e capsantina 5,6-epóxido (Sun *et al.*, 2007).

Em Portugal, a produção do pimento está disseminada um pouco por todo o País, mas é sobre tudo nas regiões do Entre-Douro e Minho e Ribatejo e Oeste que se encontram as maiores áreas e produções. As principais variedades produzidas são: o pimento-verde, pimento-vermelho e pimento-amarelo. Mais recentemente tem havido uma forte aposta nas variedades de pimento-vermelho italiano, também conhecido como pimento-doce italiano e pimento-verde padrão, devido à enorme aceitação que estes dois tipos de pimentos têm tido nos mercados. Apesar de estas variedades já estarem caracterizadas do ponto de vista nutricional, poucos estudos têm sido conduzidos com as nossas variedades sobre os seus teores em compostos bioativos e as suas propriedades antioxidantes. Neste contexto, surge este trabalho no qual pretendemos caracterizar o potencial biológico das variedades de pimento produzidas em Portugal, nomeadamente pimento amarelo, pimento verde, pimento verde-padrão, pimento vermelho, pimento vermelho-italiano e ainda piri-piri, também conhecido como malagueta Portuguesa, comparativamente a outras produzidas no estrangeiro.

CAPÍTULO II- OBJETIVOS

Com este estudo pretende-se contribuir para o aumento do conhecimento nutricional, a nível das propriedades biológicas (teores em fitoquímicos e atividade antioxidante) de diferentes variedades de pimento produzidas em Portugal. Para atingir este objetivo iremos:

- (i) determinar os teores médios e avaliar a diversidade em compostos fenólicos, pigmentos fotossintéticos e carotenóides e relacionar os teores destes pigmentos com a eficiência dos solventes de extração;
- (ii) determinar o teor em capsaïcina e dihidrocapsaicina, dois importantes compostos associados à pungência que o pimento apresenta e às suas propriedades antioxidantes;
- (iii) determinar os teores médios de vitamina C, umas das qualidades primárias do pimento;
- (iv) avaliar o potencial antioxidante e anti-radicalar e relacionar a eficiência dos solventes de extração nos métodos aplicados;
- (v) avaliar a variação dos compostos bioativos e da atividade antioxidante com o método de extração.

Com estas determinações, esperamos demonstrar o elevado potencial biológico que as variedades de pimento produzidas em Portugal, pelo menos as economicamente mais relevantes, apresentam pela capacidade em ser uma fonte de natural de compostos antioxidantes relativamente a outros frutos e vegetais.

CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O pimento (*Capsicum annuum* L. e *Capsicum frutescens* L.)

3.1.1. Caracterização e centro de origem

O pimento pertence ao género *Capsicum*, está amplamente cultivado em todo o mundo, sendo utilizado como matéria-prima para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (Yamamoto & Nawata, 2005; Bento *et al*, 2007). A sua classificação botânica encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação botânica do pimento e do piri-piri.

Família	<i>Solanaceae</i>
Subfamília	<i>Solanoideae</i>
Tribo	<i>Solaneae</i>
Género	<i>Capsicum</i>
Secção	<i>Capsicum</i>
Espécies	<i>Capsicum annuum</i> L. (pimento) <i>Capsicum frutescens</i> L. (piri-piri)

Fonte: Almeida (2006).

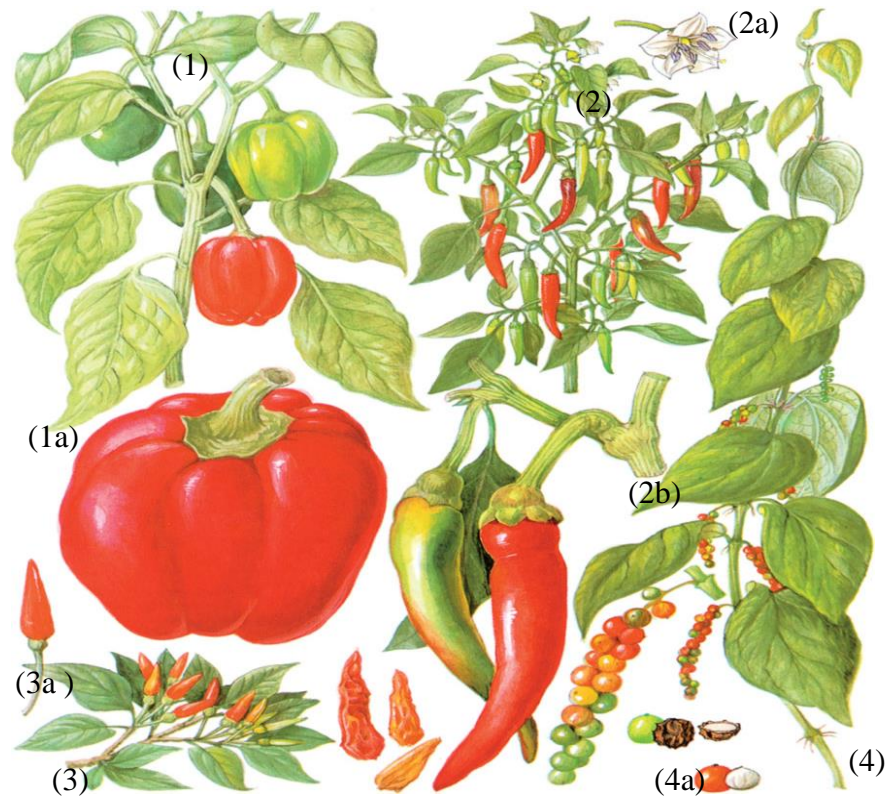
Todas as espécies do género *Capsicum* são nativas das regiões tropicais e temperadas da América e foi no tempo dos descobrimentos que foram introduzidos no resto do mundo através de Cristóvão Colombo durante a sua primeira viagem (1493). Rapidamente a cultura se expandiu para a Europa, Ásia e África.

Ainda não há consenso quanto ao número de espécies botânicas classificadas, tendo sido referenciadas 25 espécies diferentes por Eshbaugh *et al.* (1993), enquanto Reifschneider (2000) mencionou a existência de pelo menos 33 espécies. Já Carvalho *et al.* (2003), apenas reportou a existência de 20 espécies. No entanto, esse número torna-se mais pequeno quando apenas nos reportamos às espécies domesticadas. Pikergill *et al.* (1997) e Reifschneider (2000) concordaram ao afirmar a existência de cinco espécies principais cultivadas. A principal é *C. annuum*, que inclui pimentos doces e pungentes, seguida de *C. frutescens*, nome científico do piri-piri. Existem três espécies de menor importância global que são cultivadas em regiões tropicais: *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens*.

Devido á enorme diversidade fenotípica na forma, no tamanho e cor do fruto do pimento, uma forma prática de classificação deste hortícola é o agrupamento do fruto por espécie, variedade e cultivar. A distinção entre cultivar e variedade ainda não é clara, no entanto há que ter em consideração que variedade e cultivar não tem o mesmo valor para um taxonomista e para um produtor hortícola ou horticultor. No entanto, no que se refere á variedade do fruto, existem duas de maior importância: (i) variedades doces e (ii) variedades pungentes. Contudo, e dada a falta de conformidade, Almeida (2006) afirma que podemos considerar 50 a 70 tipos de fruto no género *Capsicum*. Entre os diferentes tipos de fruto do pimento destacam-se:

- o *Bell*, que representa o grupo do pimento doce de maior importância económica e o que contém maior número de cultivares doces;
- o *Pimiento*, fruto cordiforme, de sabor doce;
- o *Jalapeño*, *De Cayene*, *Habanero* e o *Tabasco*, são indicados como exemplos correspondentes a pimentos pungentes.

O cultivo do pimento ocorre na sua maioria em países tropicais, podendo comportar-se como planta anual ou perene. São uma cultura de estação quente que requer condições de cultivo similares a outras *Solanáceas*, como por exemplo o tomate. Apesar de ser sensível à geada, pode ser cultivada em ambientes temperados ou em climas mais frios sob proteção, recorrendo, por exemplo, ao uso de estufas, ou então, em ar-livre nas épocas mais quentes do ano (primavera-verão) como ocorre em algumas zonas do nosso País, ainda que seja muito frequente a cultura ser produzida em estufa. Em termos botânicos, as espécies do género *Capsicum*, são herbáceas, embora a base do caule se torne lenhosa com a idade, perenes, cultivadas como planta anual nas regiões de clima temperado. Na Figura 1 encontra-se esquematizada a caracterização botânica do género *Capsicum*.



Fonte : Vaughan & Geissler (1997).

Figura 1. Caracterização botânica do género *Capsicum*: (1) *Capsicum annuum*, (1a) Fruto; (2) *Capsicum frutescens*, (2a) Flor, (2b) Fruto; (3) *Capsicum chinense*, (3a) fruto; (4) *Capsicum Pubescens*, (4a) Fruto.

O sistema radicular é apumado; no entanto, as plantas transplantadas apresentam um sistema radicular mais ramificado e menos profundo do que plantas produzidas a partir de sementeira direta. Nas variedades atuais, o sistema radicular é relativamente pouco desenvolvido, representando cerca de 10% da massa total da planta, podendo atingir 30 cm a 60 cm de profundidade. O crescimento é do tipo indeterminado. As plantas têm um porte ereto, podendo atingir 1,5 m de altura. As flores são completas, normalmente hermafroditas, de corola simpétala rodada, com 5-7 pétalas, geralmente brancas. As espécies do género *Capsicum* são, preferencialmente, autógamas, o que facilita a sua reprodução, embora a polinização cruzada, por intermédio de abelhas e outros insetos, também possa ocorrer entre indivíduos dentro da mesma espécie e entre espécies do mesmo género. O fruto define-se como uma baga, de estrutura oca, devido ao facto de o pericarpo crescer muito mais depressa do que a placenta. A grande variabilidade morfológica apresentada pelos frutos são destacadas

pelas múltiplas formas, tamanhos, colorações e pungências. Esta última característica, exclusiva do género *Capsicum*, é atribuída aos alcalóides capsaïcina e dihidrocapsaicina, que se acumula na superfície da placenta (tecido localizado na parte interna do fruto). Geralmente, a capsaïcina e dihidrocapsaicina são responsáveis por 90% da pungência do fruto *Capsicum* (Madhumathy *et al.*, 2007). Os capsaicinóides podem ser analisados por High Performance Liquid Chromatography, HPLC. No entanto, o método de espectrofotometria também é utilizado para tal fim, pois estudos demonstram que os resultados obtidos por este método são altamente correlacionados com os obtidos por HPLC ($r = 0,93$) (Perucka & Oleszek, 2000). Já nível de pungência do fruto do pimento pode ser determinado através da escala de Scoville. Esta escala é por sua vez definida pela quantidade de capsaïcina presente nos frutos. As unidades de Scoville calculam-se multiplicando o teor da capsaïcina em gramas por peso seco das amostras pelo coeficiente correspondente à concentração capsaïcina pura, que é $1,6 \times 10^7$ (Sanatombi & Sharma, 2008). Em termos de classificação, a pungência dos frutos é medida em múltiplos de 100 unidades, existindo as seguintes classes: não pungentes (0 - 700 SHU), levemente pungentes (700 - 3000 SHU), moderadamente pungentes (3000 - 25000 SHU), muito pungentes (25000 - 70000 SHU) e altamente pungentes (> 80000 SHU).

A coloração dos frutos pode variar desde o verde, amarelo-leitoso, amarelo-forte, alaranjado, salmão, vermelho, roxo até preto. Atualmente o pimento é conhecido pela sua excelente composição nutricional, contendo uma baixa quantidade de proteínas, ácidos gordos e açúcares, e um teor elevado de pró-vitamina A (α -caroteno e β -criptoxantina), pigmentos predominantes no pimento vermelho. No pimento amarelo predomina o β -caroteno. Por outro lado, as clorofilas encontram-se em maior concentração no pimento imaturo. Acresce ainda que, o pimento se caracteriza por ser uma importante fonte de vitamina C, vitamina E (tocoferóis) e compostos fenólicos, principalmente flavonóides como a quercetina e a luteolina (Sun *et al.*, 2007). A importância desta cultura deve-se não só à sua variabilidade morfológica e genética, com sabor e aroma característicos, mas também às suas potenciais propriedades benéficas para a saúde humana. Alguns destes compostos serão aprofundados em secções seguintes.

3.1.2. O pimento no contexto da produção hortícola nacional e internacional

A geografia das preferências de consumo de pimentos está relacionada com o clima. Nas regiões temperadas, predomina o consumo de pimentos doces, enquanto nas regiões de climas quentes há preferência pelos tipos pungentes. A versatilidade deste alimento explica a facilidade de adaptação deste produto alimentar a diferentes tipos de utilizações culinárias, o que explica o seu sucesso na Europa e no Mundo.

A produção anual do pimento tem aumentado substancialmente nos últimos anos e tem vindo a notar-se um interesse crescente por esta cultura, motivado em parte pela possibilidade de escoamento da produção para a indústria, que de acordo com um inquérito à Horticultura corresponde a 57% da produção (<http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/SubFileiras/Horticultura.pdf>).

Acresce ainda que, segundo a FAO, tem-se assistido a um aumento da produção anual de pimento em 53% desde 1998 (Bosland & Votava, 2000.). Estima-se que a produção mundial do pimento *Capsicum* ultrapasse os 2 milhões de hectares no mundo, dos quais mais de metade está na Ásia, sendo a China, por si só, responsável pela produção de quase metade do total mundial, cultivando 700000 hectares no ano 2000 (Reifschneider, 2000). A Europa e a América do Norte e Central são responsáveis por cerca de 12% da produção mundial. Já o continente africano produz cerca de 9% do total mundial (Tabela 2).

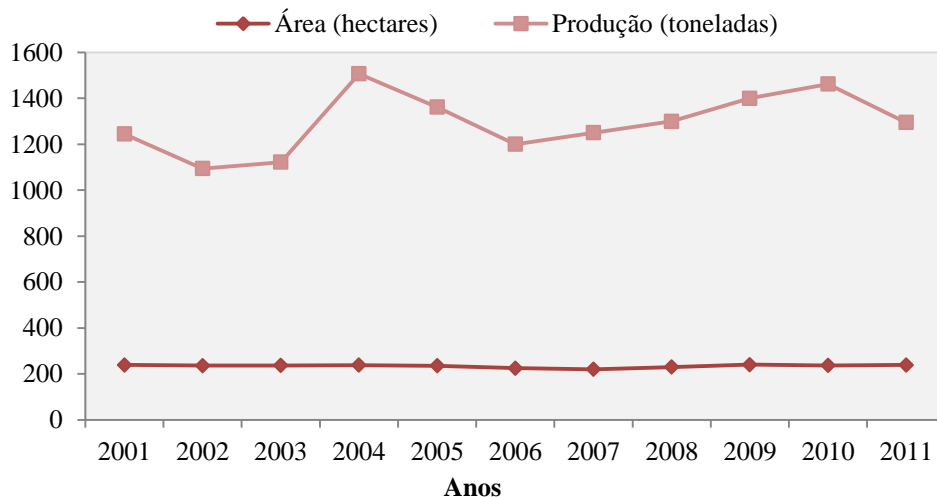
Tabela 2. A cultura do pimento no Mundo.

	<i>Área</i> (x1000ha)	<i>Produção</i> (x1000t)	<i>Produtividade</i> (tonelada/hectare)
Europa	146,5	2879,3	19,7
Ásia	992,3	14950,3	15,1
América do Norte e Central	198,1	2877,8	14,5
América do Sul	29,5	369,4	12,5
África	271,6	2027	7,5
Oceânia	2,8	46,7	16,7

Fonte: Almeida, 2006.

A produção europeia é dominada pela Bélgica, Reino Unido, Países-Baixos, Finlândia, Áustria e Espanha. A maior produção de pimento está concentrada na Bélgica, sendo que, no período de 2006 a 2011 a produtividade média anual neste país foi superior a 1500 t.hectares⁻¹, e a área de cultivo, em média, superior a 550 hectares (FAOSTAT, 2011).

Segundo dados estatísticos, entre os países da União Europeia, Portugal ainda não tem um papel representativo na produção do pimento *Capsicum*, apresentado baixa produtividade relativamente aos restantes países (FAOSTAT, 2011). No entanto, é uma cultura que tem vindo a crescer de importância económica, ainda que lentamente. De 1245 toneladas em 2001, passou em 10 anos para 1295 toneladas, o que significou um acréscimo de apenas 4 % de toneladas produzidas (FAOSTAT, 2011) (Figura 2).



Fonte: Adaptado de FAOSTAT (2011)

Figura 2. Evolução da área e produção do pimento em Portugal, entre 2001 e 2011.

Geograficamente, é no Ribatejo e Oeste que se localiza a maior mancha de produção, com 66% do total do Continente, seguindo-se o Alentejo, com 16%, e o Algarve, com 10% (<http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/SubFileiras/Horticultura.pdf>). Na região do Entre Douro e Minho, a área de produção do pimento de estufa tem aumentado, com objetivo de se conseguir um produto de melhor qualidade, com boa apresentação e melhor preço. Tem-se assistido no últimos anos a um incentivo da produção de pimento-verde padrão, destinado quer ao mercado interno onde começa já a ter grande aceitação, mas sobretudo (cerca de 90 % do total produzido) para mercados externos como é o caso de Espanha.

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento das importações do pimento ao exterior (Omaia, 2011), já que o País ainda é deficitário, importando cerca de 5 vezes mais pimentos do que exporta (Almeida, 2006). Em 2008, o valor de compras de pimento ao exterior, atingiu 6% do valor total da entrada de hortícolas (10 milhões de euros). Deste total, 96% veio de Espanha. Os Países Baixos (70%) e a Espanha (25%) foram os principais compradores de pimento português, que em conjunto adquiriram 4,4 milhões de euros (OMAIA, 2011).

3.1.3. O valor alimentar do pimento

O pimento é extremamente importante para a dieta humana, devido ao facto de ser um vegetal rico em macro e micronutrientes. É cultivado pelos seus frutos, que são objeto de múltiplas utilizações e ocupa lugar de destaque entre os vegetais mais nutritivos. Como produto hortícola, os frutos são consumidos em fresco ou cozinhados, verdes ou maduros e a sua cultura horto-industrial destina-se ao fabrico de produtos congelados, desidratados e em conserva, a mais conhecida forma são os “pickles” (pimento em calda de vinagre). O pimento também é utilizado como condimento e como matéria-prima para a extração de corantes alimentares e oleorresinas. As massas de pimento ou produtos desidratados e convertidos em pó (colorau) servem como corante e aromatizante na culinária e na indústria alimentar. Para além da utilização alimentar, dietética e medicinal, alguns pimentos são ainda cultivados como plantas ornamentais.

A concentração de macro e micronutrientes no fruto *Capsicum* varia de acordo com o seu estado de maturação. Na Tabela 3 encontram-se os valores médios referentes á composição mineral do pimento. O potássio é o mais abundante dos elementos, seguido pelo fósforo, cálcio, magnésio e sódio respetivamente. Entre os micronutrientes, o mineral que apresenta maior concentração é o ferro. Finalmente, o boro é o elemento com o teor mais baixo.

Tabela 3. Composição média em micro e macronutrientes do fruto *Capsicum*. Valores expressos em unidades por 100g de parte comestível.

Micronutrientes	Teor (mg g ⁻¹)		Macronutrientes	Teor (mg g ⁻¹)	
	<i>Pimento Verde</i>	<i>Pimento Maduro</i>		<i>Pimento Verde</i>	<i>Pimento Maduro</i>
Ferro	0,75	0,55	Sódio	2,0	5,0
Cobre	0,10	0,08	Potássio	190	260
Zinco	0,18	0,26	Cálcio	11,0	10
Manganésio	0,10	0,10	Magnésio	12,0	14,0
Boro	0,05	0,07	Fósforo	30	30

Fonte: Rubio et al., 2002

O pimento apresenta também consideráveis teores em vitaminas, principalmente ácido ascórbico (vitamina C), com cerca de 80,4 mg.g⁻¹ de parte comestível (Tabela 3). Segundo o Anexo I (a que se refere o 3º artigo) do Regulamento (CE) n.º 54/2010 de 28 de Maio que diz respeito às doses diárias recomendadas (DDR) e aos fatores de conversão em energia, ingerir pimentos significa ingerir cerca de 15% de vitamina C necessária diária recomendada. Na Tabela 4 encontram-se expressos os teores vitamínicos do pimento.

Tabela 4. Teores vitamínicos médios, do pimento verde e pimento maduro.

<i>Vitaminas</i>	<i>Pimento Verde</i>	<i>Pimento Maduro</i>
Tiamina (mg)	0,09	0,09
Riboflavina (mg)	0,05	0,09
Niacina (mg)	0,55	0,95
Ácido ascórbico (mg)	80,4	242
Vitamina B ₆ (mg)	0,16	0,28

Fonte: Bosland & Votava, 2000

Atualmente o pimento é conhecido pela sua excelente composição nutricional, contendo uma baixa quantidade de açúcares, proteínas, ácidos gordos, e elevados teores em fitoquímicos comparativamente a outros produtos vegetais, dos quais se destacam:

os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, carotenóides, antocianinas, entre outros. (Delgado-Vargas & Paredez-Lopez, 2003; Shetty, 2004). Na Tabela 5 estão evidenciados os teores médios em percentagem para as proteínas, hidratos de carbono, fibras, entre outros constituintes, apresentados pela USDA na National Nutrient Database for Standart Referenceque.

Tabela 5. Composição média do pimento verde e pimento maduro.

Nutrientes e Energia	<i>Pimento Verde</i>	<i>Pimento Maduro</i>
Água (%)	94	92
Energia (Kcal)	20	26
Proteína (%)	0,9	1,0
Gordura (%)	0,2	0,3
Hidratos de carbono (%)	4,6	6,0
Fibra (%)	1,7	2,0

Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference releases 25

(<http://ndb.nal.usda.gov/>)

3.2. Os compostos bioativos

A dieta habitual fornece, além dos nutrientes essenciais alguns compostos químicos, presentes em sua maioria em frutas e hortaliças, que exercem uma importante atividade biológica, já comprovada por vários estudos. Esses compostos são chamados de compostos bioativos ou, algumas vezes, de fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana. O estudo desses compostos bioativos inspirou o conceito de alimentos funcionais (Arabbi *et al.*, 2004) que levou em 1980 o governo japonês a regulamentar o uso de alimentos comercializados, até então, como alegadamente promotores de saúde, introduzindo o conceito de alimento funcional. O termo começou a ser utilizado pela indústria para descrever alimentos fortificados com ingredientes específicos, inferindo-lhes certos benefícios à saúde. Vários fatores contribuíram para o aparecimento dos alimentos funcionais, nomeadamente: (i) questões concorrenciais e de marketing; (ii) envelhecimento da sociedade e inversão da pirâmide populacional; (iii) evidência clínica da bioatividade de alguns compostos dos alimentos;

(iv) avanços científicos e inovação tecnológica; (v) diferenciação entre marcas, e (vi) uma maior apetência do consumidor para este tipo de produtos. Segundo a *Functional Food Science in Europe* apresenta o seguinte conceito sobre o significado de um alimento funcional: "Um alimento pode ser considerado como funcional se estiver demonstrado que apresenta efeito fisiológico benéfico para a saúde e/ou redução dos riscos de doenças crónicas, para além da função nutricional básica. O ingrediente funcional tem que permanecer no alimento e demonstrar os seus efeitos nas quantidades em que é ingerido na dieta. Deve ser consumido regularmente, como parte de uma dieta variada" (Diplock, 1999). Os diferentes compostos funcionais apresentam algumas características em comum: (i) pertencem a alimentos do reino vegetal; (ii) são substâncias orgânicas e geralmente de baixo peso molecular; (iii) não são indispensáveis nem sintetizados pelo organismo humano e (iv) apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas.

Atualmente a população tem uma maior consciência da importância dos produtos naturais e, assim, os compostos bioativos produzidos *in natura* têm procura crescente por diversas indústrias, tais como a farmacêutica, cosmética e alimentar (Croteau *et al.*, 2000; Pichersky & Gang, 2000).

Harborne *et al.* (2000) afirma que o pimento tem assumido o papel de alimento funcional, devido ao facto de ser um reservatório de diferentes compostos considerados bioativos, entre os quais os compostos fenólicos, os carotenóides e ácido ascórbico (vitamina C). Os mesmos autores, consideram que estes compostos são responsáveis por exercer influência na redução do risco do desenvolvimento de doenças crónicas não-transmissíveis, como cardiovasculares, distúrbios metabólicos, doenças neuro-degenerativas e enfermidades inflamatórias. De entre os diferentes compostos bioativos existentes, os compostos fenólicos assumem um enorme destaque, devido aos variadíssimos estudos sobre eles realizados. Estes compostos, devido à sua ampla distribuição na natureza, constituem um dos grupos mais numerosos de metabolitos. Pela sua ubiquidade e simultaneamente pela sua presença característica dentro de grupos botânicos, alguns deles podem ser considerados marcadores químicos em sistemas taxonómicos, sendo muitas vezes utilizados no controlo de qualidade e na avaliação da autenticidade de produtos naturais (Valentão *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos estão presentes praticamente em todas as partes dos vegetais, distribuídos pelos diferentes órgãos e desempenham diversas funções essenciais, nomeadamente no processo de polinização, no crescimento celular, na defesa contra pragas, contra infeções microbianas, na proteção contra radiações ultravioleta, e na modelação da distribuição de hormonas e como moléculas de sinalização para microrganismos simbióticos (Brand-Williams *et al.*, 1995). São substâncias formadas no mínimo por um anel aromático, em que pelo menos um hidrogénio é substituído por um grupo hidroxilo. A maioria é encontrada na natureza sob a forma de ésteres ou de anéis heterocíclicos e não na forma livre (Simões *et al.*, 2000).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos assenta essencialmente no elevado potencial que apresentam para sequestrar radicais livres. A estrutura da molécula é um fator-chave, uma vez que a capacidade antioxidante dos compostos depende da quantidade e da posição dos grupos hidroxilo (Balasundram *et al.*, 2006).

Existe uma grande diversidade de compostos fenólicos, sendo os mais comuns os flavonóides. Estes compostos encontram-se frequentemente oxigenados e a maioria está conjugada com açúcares, sendo também chamados de heterósidos. Já na forma livre, são denominados agliconas (Simões *et al.*, 2000). A Figura 3 mostra uma estrutura básica dos flavonóides que consiste num esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6) com dois anéis benzénicos (A e B) ligado a um anel de pirano (C).

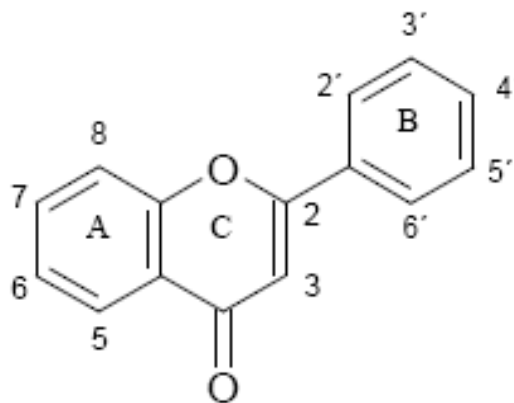


Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides

A atividade antioxidante dos flavonóides é determinada pela sua estrutura, em particular pelo número e arranjo dos grupos funcionais em torno do esqueleto base destas moléculas. Assim, a configuração dos grupos hidroxilo do anel B é a principal

responsável pelo sequestro de espécies reativas de oxigénio e azoto; a existência da dupla ligação entre C2 e C3 em combinação com grupo carbonilo na posição 4 do anel C contribui também para o potencial antioxidante destes compostos e a presença de grupos hidroxilo na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A facilita a deslocação de eletrões entre os anéis A e B e a estabilização por ressonância (Figura 3).

Relativamente aos carotenoides, embora sejam micronutrientes e por isso presentes em concentrações muito baixas, (microgramas por grama), estão entre os constituintes alimentícios mais importantes. Além de serem pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo a laranja ou vermelho de muitas frutas e legumes, são também substâncias bioativas, com efeitos benéficos à saúde.

Os carotenoides intervêm na fotossíntese e estão localizados nos organelos subcelulares, cloroplastos e cromoplastos. Nos cloroplastos encontram-se associados principalmente às proteínas e são, normalmente, ocultados pela presença de outros pigmentos clorofilinos dominantes, α e β carotenos, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, estando complexadas não-covalentemente com proteínas. Quimicamente, classificam-se como terpenos e constituem-se de uma cadeia de hidrocarbonetos contendo tipicamente de 9 a 13 duplas ligações conjugadas composta por unidades denominadas isoprênicas. Essa estrutura conjugada dos carotenoides é que permite a absorção da luz ultravioleta, que fornece as cores características destes compostos. Os carotenoides atuam em conjunto, e apesar das suas semelhanças estruturais desempenham funções biológicas distintas.

Existem na natureza, aproximadamente 600 carotenoides, os quais são constituídos por dois grandes grupos: (i) carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros e (ii) xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (Haegelle *et al.*, 2000; Maldonade, 2003). Estes compostos apresentam isomerização *cis-trans*, e ambos os grupos isoméricos, podem ser encontrados em diferentes culturas hortícolas, entre as quais feijão-verde, brócolos, cenoura, alface e tomate (Howard *et al.*, 2000; Nicolle *et al.*, 2004; Mou *et al.*, 2005). Os isómeros *cis* são menos estáveis termicamente do que as formas *trans*. Agentes como calor, ácidos, luz, oxigénio e enzimas, como lipoxigenases, provocam a alteração nos carotenoides, resultando em formação de isómeros *cis*, diminuição da cor, e quebra da cadeia com formação de apo carotenoides (carotenoides com menos de 40 átomos de carbono) (Costa *et al.*, 2002; Melendéz-Martínez *et al.*, 2004), Os *trans* carotenos podem converter-se em *cis*

carotenos pelo processamento de alimentos, tais como: cocção, desidratação e trituração (Rodriguez-Amaya & Farfan, 1992).

Neste contexto, os estudos clínicos e epidemiológicos são extremamente importantes para avaliar a relação entre o consumo destes compostos na alimentação ou em suplementos nutricionais e os potenciais efeitos benéficos para a saúde (Ross & Kasum, 2002; Manach *et al.*, 2004; Arts & Hollman, 2005).

3.3. Propriedades biológicas dos compostos bioativos

O ser humano aprendeu a utilizar matrizes naturais, principalmente de origem vegetal, com o intuito de tratar diversas doenças. Assim, diversas atividades biológicas têm sido atribuídas ao pimento, que como foi referido em seções anteriores é uma excelente fonte de compostos bioativos que têm sido alvo de vários estudos permitindo o conhecimento da possível acção entre estes compostos e quais os alvos moleculares associados a vários tipos de doenças. Contudo, a atividade antioxidante do pimento é a que mais se tem destacado (Sun *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2012). Segundo Sun *et al.* (2012) as diferentes colorações do fruto do pimento são características importantes que reflectem a actividade antioxidante deste hortícola. No entanto, a atividade antimicrobiana (Wahba *et al.*, 2010; Olumuyiwa *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (Hermández-Ortega *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013) também tem sido descrita com especial atenção.

Os polifenóis têm demonstrado, quer em modelos animais quer em sistemas *in vitro*, ter outros efeitos para além das propriedades antioxidantes, como seja a: regulação do óxido nítrico, indução da expressão genética na proliferação celular e na apoptose, inibição da proliferação celular e angiogénese, modulação da atividade enzimática, estimulação do sistema imunitário, regulação do metabolismo hormonal, atividade anti-inflamatória e ação antibacteriana e antiviral. Estes efeitos parecem contribuir para o papel protetor dos polifenóis no cancro e em doenças cardiovasculares (Ross & Kasum, 2002; Liu, 2004; Arts & Hollman, 2005). Também estudos experimentais recentes em animais e humanos demonstraram que o aumento da ingestão de polifenóis pode contribuir para a prevenção da formação do LDL colesterol oxidado (Sun *et al.*, 2007), reduzir a tendência do sangue a formar coágulos, manter os níveis de pressão sanguínea e aumentar a capacidade antioxidante total do sangue (Manach *et al.*,

2004). Outros estudos epidemiológicos sugerem ainda que os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas, nomeadamente antiviral (Liu, Wang, Lee, Wang, & Du, 2008), antimutagénica, imunomoduladora, protecção do miocárdio e hepatoprotectora (Kamalakkannan & Prince, 2006 ; López-Lázaro, 2009), ação anti- alérgica (Seelinger, Merfort, & Schempp, 2008), anti-inflamatória (Loke *et al.*, 2008) e atividade antibacteriana (Hong *et al.*, 2006). Alguns autores indicaram também uma associação inversa entre a ingestão dietética de flavonoides e o risco de acidente vascular cerebral (Hertog *et al.*, 1993; Knekt *et al.*, 1996; Keli *et al.*, 1996). Também o uso de extratos de pimento na medicina tradicional deve-se ao seu efeito analgésico, que é associado ao teor em flavonóides (Adnam *et al.*, 2013). Por outro lado, os carotenoides são descritos por apresentarem atividade biológica, apesar de se encontrarem em concentrações reduzidas nos pimentos (Mazourek *et al.*, 2009; Meghvansi *et al.*, 2010).

A capsaicina e a dihidrocapsaicina são alcalóides responsáveis pela pungência dos pimentos, atuando sobre o mecanismo da percepção da dor. Atualmente, a capsaicina é utilizada para o tratamento da neuropatia diabética, a osteoartrite, a neuralgia pós-herpética e psoríase (Jin *et al.*, 2011). Outros autores referem que a principal utilização médica da capsaicina é em formulações tópicas para a artrite (Santos *et al.*, 2006). Em termos de aplicação industrial, a capsaicina é utilizada como aditivo alimentar (Rosa *et al.*, 2002; Meghvansi *et al.*, 2010). A dihidrocapsaicina também tem sido descrita como antioxidante (Meghvansi *et al.*, 2010). As potencialidades biológicas do género *Capsicum* na prevenção ou tratamento de doenças relacionadas com o sistema nervoso foram atribuídas à sua composição em capsaicinóides e flavonóides (Gomes *et al.*, 2009).

Não só ao fruto do pimento têm sido direccionados estudos, também as sementes têm sido valorizadas. Alguns autores isolaram alguns dos compostos da semente de *Capsicum* tais como, saponinas e peptídeos e, avaliaram a actividade antimicrobiana concluindo que apresentavam uma forte atividade contra leveduras e fungos (Iorizzi *et al.*, 2002). Mais recentemente, Diz *et al.* (2006) obtiveram a partir das sementes de *C. annuum* extratos ricos em peptídeos e demonstraram que também possuíam atividade inibitória sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Outros autores relatam que também as folhas do pimento têm actividade biológica devido ao potencial em carotenoides (Lee *et al.*, 2002). Recentemente Ku & Kamu (2010) isolaram

compostos bioativos das folhas *Capsicum* e relataram a importância deste subproduto com actividade quimiopreventiva, atribuída ao elevado conteúdo em carotenoides.

3.4. Fatores que influenciam a disponibilidade dos compostos bioativos

Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, são biologicamente ativos, isto é, têm ação tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, entre outras como foi referido na seção anterior. Estes compostos são usados para as mais diversas finalidades, tanto na terapêutica médica para prevenir doenças, como na indústria de cosméticos e de alimentos, servindo como aromatizantes ou antioxidantes. Estudos experimentais com seres humanos revelaram a capacidade destes alimentos e de alguns dos seus constituintes em atuar como agentes antioxidantes em processos de destoxificação, alterando o perfil enzimático e o sistema imunitário. Muitos compostos têm sobreposição de mecanismos de ação e, dentro do contexto de alimento vegetal ou mesmo numa dieta à base de vegetais, podem ter um efeito aditivo, sinérgico ou até efeitos inibitórios sobre outros. Assim, a disponibilidade dos compostos bioativos presentes nos alimentos de origem vegetal, neste caso o pimento, depende de diferentes fatores que podem ser englobados em três fases: uma primeira fase a montante da colheita, uma segunda fase em período de pós-colheita e uma terceira fase que compreende o organismo humano e a capacidade de absorção dos nutrientes em função do genótipo e da matriz alimentar que cada indivíduo utiliza. De acordo com Tiwari & Cummins (2013) nas duas primeiras fases podemos encontrar fatores como: características genéticas, condições edáfo-climáticas, práticas culturais, corte e colheita. Por outro lado, o processamento dos alimentos assim como os fatores de armazenamento, transporte e conservação estão relacionados com os fatores de pós-colheita (Sikora *et al.*, 2008). Contudo, quando avaliamos a variação dos diferentes teores em compostos nas plantas e a sua disponibilidade para o consumidor é importante considerar que fatores como o genótipo (Kaur & Kapoor, 2002; Singh *et al.*, 2006) e condições de produção, nomeadamente humidade do solo, temperatura, fertilização e irrigação, têm sido relatadas por afetar o teor fitoquímico em produtos vegetais (Oh *et al.*, 2009; Tiwari & Cummins, 2009), mas também as condições de colheita e pós-colheita podem condicionar os seus teores, uma vez que o pimento pode ser objeto de

diversos tipos de transformação industrial, dos quais se destacam a congelação, a secagem (desidratação), seguida ou não de redução a pó, e a extração de oleorresina, processos que afetam qualitativamente e quantitativamente os teores de compostos bioativos e conseqüentemente a sua atividade biológica. Contudo, outros autores referem que na generalidade o genótipo influencia mais significativamente os teores de compostos bioativos presentes nas plantas que as condições de pós-colheita e conservação (Matssura-Endo, 2006). Mais recentemente Lopez-Berengue et al. (2007) relataram que as condições de refrigeração, transporte, tipo de atmosfera utilizada, período de vida na prateleira, podem interferir de uma forma mais eficaz na qualidade e na quantidade de compostos considerados benéficos.

Um outro fator a ter em conta quando abordamos o tema da biodisponibilidade dos compostos bioativos é sua capacidade de absorção, uma vez que a sua presença num alimento podem não ser indicativo de ingestão por parte do organismo (Matusheki *et al.*, 2006). Assim, de um modo geral e tendo em conta todos estes condicionantes devem ser encontradas formas de produção, preparação e preservação que efetivamente retardem a degradação dos compostos bioativos, preservando ou até mesmo incrementado o seu valor biológico (Tiwari & Cummins, 2013).

CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras vegetais

Em Portugal a cultura do pimento (*Capsicum annuum* L.) tem uma larga expressão no seio das culturas hortícolas de primavera-verão. As variedades mais produzidas em Portugal são o pimento-verde, pimento-vermelho e o pimento-amarelo, seguindo-se em menor expressão o pimento verde-padrão e o pimenta-malagueta, mas cuja produção entre nós tem vindo a aumentar. Do ponto de vista de consumo alimentar também são estas variedades mais consumidas. Com base neste pressuposto escolhemos para a realização deste trabalho diferentes variedades, de diferentes origens, que se descrevem no Tabela 6.

Tabela 6. Material vegetal utilizado no estudo.

Nome vulgar	Nome científico	Origem
Pimento amarelo	<i>Capsicum annuum</i> L	Portugal
Pimento verde	<i>Capsicum annuum</i> L	Portugal
Pimento verde-italiano	<i>Capsicum annuum</i> L	Itália
Pimento verde-padrão	<i>Capsicum frutescens</i> L	Espanha
Pimento vermelho	<i>Capsicum annuum</i> L	Portugal
Pimento vermelho-italiano	<i>Capsicum annuum</i> L	Itália
Piri-piri ou pimenteiro-de caiena	<i>Capsicum frutescens</i> L	Comercial

4.1.1. Preparação das amostras

Para a avaliação do teor em compostos bioativos e da actividade biológica das variedades em estudo, houve a necessidade de proceder previamente à preparação das amostras em função quer dos métodos de extração, quantificação e identificação de compostos bioativos quer dos métodos de medição da actividade biológica. Essa preparação e esses métodos são descritos nos parágrafos seguintes.

4.1.2- Preparação de Extratos

Depois de reunidas para o estudo, as amostras vegetais foram liofilizadas (Dura-dry™ μ P-FTS Systems, EUA) e trituradas separadamente (Figura 4). De seguida, de cada uma das amostras retirou-se 20 g de peso seco. Cada um destes 20 g foi submetido a uma extração em Soxhlet com 500 mL de diferentes solventes com polaridade distinta segundo a ordem: hexano, acetato de etilo, metanol 80% e metanol 100%. Cada extração demorou 4 h. Decorrido esse período, os extratos foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo a 40 °C até à evaporação total do solvente. Os extratos secos foram armazenados a -20 °C até posterior análise.



Figura 4. Algumas das amostras preparadas para extração em Soxhlet (1-pimento amarelo; 2- Pimento vermelho; 3-Pimento verde-italiano; 4-Pimento vermelho-italiano; 5- pimento verde).

4.2. Determinação do teor médio em fenóis totais (capacidade redutora total) e flavonoides totais

O teor em fenóis totais, também hoje conhecido como capacidade redutora total, foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin & Ciocalteu adaptado de Dewanto (2002). Existem vários métodos para a quantificação dos compostos fenólicos. O método que utiliza o reagente de Folin (Fluka) foi utilizado na quantificação destes compostos. A base química desta metodologia é a redução pelos grupos hidroxifenólicos de iões Fe^{3+} a Fe^{2+} formando complexos com ferrocianeto, produzindo pigmentos de coloração azul. A partir dos extratos obtidos anteriormente (4.1.2) prepararam-se concentrações de 5 mg.mL^{-1} com metanol 90% e determinou-se o teor em fenólicos totais. Para tal, em tubos de 10 mL adicionou-se 50 μ L de cada um dos extratos (4.2) 2,5 ml do reagente Folin-ciocalteu (Folin: água, 1:10, v/v) e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5 %. A mistura resultante foi incubada durante 15 minutos a 45°C em banho-maria, após o qual se leu as absorvâncias a 765 nm no espectrofotómetro de UV visível (U-2000, Itachi, Japão) contra um branco (solvente usado na extração das amostras, em vez destas). Para a quantificação realizou-se uma curva padrão com ácido

gálico (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE).g⁻¹ de peso seco. As análises foram realizadas em triplicado. A curva de calibração obtida originou a seguinte equação utilizada na quantificação dos fenólicos totais: $y=0,5915x - 0,0681$ ($R^2=0,9927$).

Para a avaliação do teor de flavonoides totais utilizou-se o método espectrofotométrico baseado no ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio (AlCl₃) adaptado por Javanmardi (2003) e Chun (2004). Para tal, em tubos de 10 mL adicionou-se 1 mL de extracto obtido anteriormente (4.1.2), contendo 4 mL de água ultrapura e 0,3 mL de nitrito de sódio 5%. A mistura ficou em repouso durante 5 min à temperatura ambiente e seguidamente adicionou-se 0,3 mL de cloreto de alumínio. Seguiu-se um repouso de seis minutos à temperatura ambiente e adicionou-se prontamente 2 mL de hidróxido de sódio 1M, e completou-se o volume para 10 mL com água bidestilada. Seguidamente leram-se as absorvâncias a 510 nm no espectrofotómetro de UV visível contra um branco. Para a quantificação realizou-se uma curva padrão com o padrão comercial catequina (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (CAE).g⁻¹ de peso seco. As análises foram realizadas em triplicado. A curva de calibração obtida originou a seguinte equação: $Y = 1,218x + 0,0976$ ($R^2=0,9953$).

4.3. Determinação de teor médio em clorofila a, clorofila b e carotenoides totais

A avaliação quantitativa do teor médio em carotenoides totais e clorofilas a e b, presentes nas diferentes variedades de pimento, foi realizada pelo método espectrofotométrico de Lichtenthaler & Wellburnn (1985) com ligeiras adaptações. Assim, a partir dos extratos obtidos anteriormente (4.1.2) e mediram-se diretamente as absorvâncias das amostras a diferentes comprimentos de onda, de acordo com os solventes utilizados e de acordo com as equações seguintes:

■ *Acetato de etilo:*

$$C_a = 10,05 * A_{662} - 7,340 * A_{644}$$

$$C_b = 16,37 * A_{644} - 3,140 * A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 * A_{470} - 1,280 * C_a - 56,7 * C_b / 230$$

■ *Metanol:*

$$C_a = 15,65 * A_{666} - 7,340 * A_{653}$$

$$C_b = 27,05 * A_{653} - 11,21 * A_{666}$$

$$C_{x+c} = 1000 * A_{470} - 2,860 * C_a - 129,2 * C_b / 245$$

■ *Hexano:*

$$C_a = 11,75 * A_{662} - 2,350 * A_{645}$$

$$C_b = 18,61 * A_{645} - 3,960 * A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 * A_{470} - 2,270 * C_a - 81,4 * C_b / 227$$

4.4. Determinação do teor médio de Vitamina C total

Para a determinação do teor de vitamina C total, presente nas diferentes amostras, foi utilizado o método espectrofotométrico de Klein e Perry (1982), com ligeiras modificações. A partir de cada um dos extratos secos pesou-se 20 mg ao qual se adicionou 10 mL de ácido metafosfórico a 5% ((HPO₃)n, 79615, Fluka)). A mistura resultante ficou em agitação à temperatura ambiente durante 45 minutos. Decorrido esse período de incubação filtrou-se o extrato obtido, retirou-se 1mL do filtrado obtido e adicionou-se 9 mL da solução de 2,6 dicloroindofenol (DIP) preparada previamente. Agitou-se em vortex e leram-se as absorvâncias de imediato em espectrofotómetro UV visível a 515 nm. A reação que se verificou foi uma reação redox, na qual a solução ácida do ácido ascórbico com DIP torna-se incolor ao ser reduzido pelo ácido ascórbico. Quando todo o ácido ascórbico foi oxidado, o remanescente DIP deu à solução uma cor rosa.

Para a quantificação do teor de vitamina C foi necessária a realização de uma curva padrão sendo que o padrão utilizado foi o ácido L- ascórbico (Sigma-Aldrich) que foi preparado como se de uma amostra se tratasse. Este procedimento foi necessário para expressar o teor de vitamina c das amostras em mg.g⁻¹. equivalentes de ácido L-ascórbico.

A curva de calibração obtida originou a seguinte equação utilizada para avaliação do teor de vitamina C: $Y = -4,9171 x + 0,7135$ ($R^2=0,9989$).

4.5. Determinação do teor médio em β – Caroteno por HPLC

Para a quantificação de β -caroteno por HPLC pesou-se 1 g de amostra seca e liofilizada para tubos de centrífuga de 12 mL ao qual foi adicionado 10 mL da mistura hexano: éter-dietilo (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:1. Seguidamente foi adicionado 25 μ L de padrão interno APO (*trans*- β -Apo-8'-caroteno, Sigma-Aldrich). A mistura foi deixada em agitação durante 10 minutos. Decorrido este período de tempo, centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm durante 10 minutos. Reservou-se o sobrenadante, desprezou-se o precipitado e repetiu-se o processo de extração duas vezes. No final, combinaram-se os sobrenadantes e evaporaram-se os extratos até à secura total em evaporador rotativo a 40 °C. Seguidamente, ressuspendeu-se o evaporado em 2 mL de hexano: acetona (1:1) e transferiram-se 2 mL para vials de HPLC. A partir daqui procedeu-se à identificação e quantificação do teor em β -caroteno por HPLC, utilizando uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4.6 mm, 5 μ L) (Spherisorb ODS2, Phase Separations da Waters), uma fase móvel de acetonitrilo:água (90:10) (solvente A) e acetato de etilo (solvente b). A eluição foi realizada a um fluxo de solvente de 1,0 mL.min⁻¹, com gradiente a começar com 100 % de A, com uma duração de 55 minutos, sendo o volume de injeção de 20 μ L. Os cromatogramas foram registados a 447, 470, e 520 nm. A identificação do foi feita por comparação com padrões comerciais externos (Extrasynthese, França), através dos respetivos tempos de retenção e espectros UV. A quantificação do β -caroteno foi feita utilizando parâmetros como o volume de extração, volume de injeção, área do padrão interno, área do composto em questão. Os resultados foram expressos em μ g.g⁻¹ de peso seco. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

4.6. Determinação do teor médio em fenólicos e flavonoides individuais por HPLC

A identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos e flavonoides individuais foram realizadas em HPLC. Numa primeira fase, procedeu-se à extração e preparação das amostras e numa segunda fase procedeu-se à realização da análise em HPLC. Assim na fase de extração pesaram-se 40 mg de peso seco cada uma das amostras vegetais para microtubos com tampa de 2 mL e adicionou-se 1 mL de metanol a 70 %. Seguidamente os microtubos contendo extratos foram colocados num bloco de aquecimento (Thermobloc) a 75 °C durante 30 minutos, sendo agitados no vortéx a cada

5 minutos. Decorrido este tempo, procedeu-se à centrifugação dos extratos a 4000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente (Kubota 2100, Japan). Recolheu-se e filtrou-se (Spartan 13/0,2 RC, 0,2 μm , WhatmanTM) o sobrenadante para vials de HPLC e rejeitou-se o precipitado. O sobrenadante foi transferido para vials de HPLC, os quais foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua análise. A partir daqui procedeu-se à identificação e quantificação dos fenólicos individuais por HPLC equipado com um detetor UV fixado a 229 nm, uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4.6 mm, 5 μL) (Spherisorb ODS2, Phase Separations da Waters), uma fase móvel de água com 1% de ácido tricloroacético (TFA) (solvente A) e acetonitrilo (acetonitrilo, CH₃CN, HPLC gradient, Merck) com 1% de TFA (solvente B). A eluição foi realizada a um fluxo de solvente de 1,0 mL.min⁻¹, com gradiente a começar com 100 % de A, sendo o volume de injeção de 10 μL . Os cromatogramas foram registados a 280, 320, 370 e 520 nm. A identificação dos compostos fenólicos individuais foi feita por comparação com padrões comerciais externos (Extrasynthese, França), através dos respetivos tempos de retenção e espectros UV. A quantificação foi feita utilizando parâmetros como o volume de extração, volume de injeção, área do padrão interno e área do composto em questão. Os resultados foram expressos em mg.g⁻¹ de peso seco. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

4.7. Determinação do teor médio em capsaicinóides por HPLC

O teor médio em capsaicina e dihidrocapsaicina foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Othman *et al.* (2011), com ligeiras modificações. Assim a partir dos extratos secos das amostras extraíram-se em etanol na de 1:10 (m/v) (5g de peso seco para 50 mL de etanol) a 80°C durante 4 h. Decorrido este período os extratos etanólicos foram deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente. Seguidamente, retirou-se 5 mL do sobrenadante e filtrou-se diretamente (filtros Spartan 13/0,2 RC, 0,2 μm , WhatmanTM) para vials de HPLC que foram armazenados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem os extratos serem analisados por HPLC. Em HPLC utilizou-se uma Coluna C18 (dimensão 150 x 4.6 mm, 3 μm) a 60°C, com uma fase móvel acetonitrilo:água (50:50 v/v), um gradiente isocrático com um fluxo de 1,5 mL.minuto⁻¹ e um volume de injeção de 5 μL . A deteção destes dois compostos foi feita a um comprimento de onda de 222 nm. A identificação e quantificação foram feitas por comparação dos tempos de retenção dos padrões comerciais capsaicina e dihidrocapsaicina (Sigma-Aldrich) e

respetivas curvas de calibração externas. Todas as determinações foram feitas em triplicado.

4.7.1. Determinação da pungência (Unidades de Scoville)

As unidades de Scoville permitem a classificação de um produto alimentar em função da sua pungência (Sanatombi & Sharma, 2008). Estas unidades fazem parte de uma escala, também conhecida como a escala de Scoville que é por sua vez definida pela quantidade de capsaicina presente nos frutos. As unidades de Scoville calculam-se multiplicando o teor da capsaicina em gramas por peso seco das amostras pelo coeficiente correspondente à concentração capsaicina pura, que é $1,6 \times 10^7$ (Sanatombi & Sharma, 2008). Em termos de classificação, a pungência dos frutos é medida em múltiplos de 100 unidades, existindo as seguintes classes: não pungentes (0 - 700 SHU), levemente pungentes (700 -3000 SHU), moderadamente pungentes (3000 - 25000 SHU), muito pungentes (25000 - 70000 SHU) e altamente pungentes (> 80000 SHU).

4.8. Atividade Antioxidante

Nos ensaios *in vitro* da atividade antioxidante foram usados os extratos anteriormente preparados para a caracterização do perfil químico das diferentes amostras (4.2). O potencial antioxidante foi avaliado segundo diferentes métodos: (I) efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), (II) captura do radical livre ABTS⁺, (III) poder redutor, (IV) quelatização de metais, (V) descoloração da emulsão β -Caroteno/ácido linoleico e por último (VI) através do método de aprisionamento de radicais hidroxilo.

4.8.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, foi realizada de acordo com Sánchez-Moreno (1998), com ligeiras modificações. O método foi conduzido em microplacas de 96 poços (Costar, Thermofisher, EUA). Assim, em cada poço da microplaca, colocou-se 100 μ L dos extratos a 5 mg.mL^{-1} e adicionou-se 100 μ L

de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH ($6 * 10^{-5}$ M). A mistura foi colocada no escuro durante 60 minutos à temperatura ambiente. Terminado este período, procedeu-se à leitura das absorvâncias num leitor automático de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific) a 517 nm. Os resultados foram expressos em percentagens, através da seguinte equação que corresponde a quantidade de DPPH aprisionada pelos compostos antioxidantes nas amostras:

$$\% \text{ AA} = [(Abs_{\text{Branco}} - Abs_{\text{Amostra}}/Abs_{\text{Branco}}] * 100$$

Fez-se igualmente a leitura de um branco (solvente de preparação das amostras) como se de uma amostra tratasse por forma a ser utilizado na equação matemática que foi utilizada na quantificação da atividade antioxidante. Todas as determinações foram feitas em triplicado e os resultados expressos como a média \pm desvio padrão da média (SD) das três repetições.

4.8.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical livre *ABTS*⁺

A determinação da atividade antioxidante pelo método da captura do radical *ABTS*⁺ foi realizada segundo o método descrito por Sratil (2006) com ligeiras modificações. Esse método, normalmente designado por método de ABTS está baseado na capacidade dos antioxidantes em capturar o catião *ABTS*⁺. Para a determinação da actividade antioxidante através deste método preparou-se antecipadamente a solução *ABTS*⁺ a partir de 7 mM de ABTS (Sigma-aldrich) com 4,95 mM de Persulfato de Potássio (Sigma-Aldrich) em metanol. A solução ficou em repouso, no escuro, durante pelo menos 16 h à temperatura ambiente para formar catiões radicais *ABTS*⁺. Esta solução é considerada solução stock. Em seguida diluiu-se esta solução stock em metanol 50 %, até se obter absorvâncias compreendidas entre 0,70 e 0,85 a 734 nm. Esta solução foi então utilizada na determinação da atividade antioxidante. A partir dos extratos preparados a uma concentração de 5 mg.mL⁻¹ foram aplicados 50 μ L em microplacas de 96 poços (Costar, Thermofisher), adicionou-se 100 μ L de solução *ABTS*⁺. E colocou-se a placa com a mistura ficou em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período, as absorvâncias foram a 734 nm em leitor automático de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Esse método, baseia-se na geração $ABTS^+$ que apresenta cor azul esverdeado por meio da reacção do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução de $ABTS^+$ a ABTS promovendo a perda da coloração. Com a perda de cor, a percentagem de inibição é determinada em função do branco, de amostra e/ou padrão, através da seguinte fórmula:

$$\% AA = [(Abs_0 - Abs_{Amostra})/Abs_0] * 100$$

O valor de Abs_0 é dado pelo valor da representa a absorvância do ABTS sem extracto. Todas as determinações foram feitas em triplicado. E as percentagens de atividade antioxidante foram expressas como a média \pm desvio padrão da média (SD) das três repetições.

4.8.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método da quelatização de metais

O potencial de quelatização de Fe^{2+} foi avaliado por espectrofotometria adaptando o método de Gülçin (2004). Esta metodologia utiliza como agente complexante o ião 2,4,6-tris (2-piridil)-1,3,5-triazina (ferrozina) (Sigma-Aldrich). As concentrações aplicadas neste método foram de 5 mg.mL^{-1} . Para a reacção foram utilizados 0,4 mL de extrato. Aos extratos adicionou-se 0,2 mL de 2 mM Cloreto de Ferro (II) (Sigma-Aldrich) e seguidamente 0,4 mL de Ferrozina (5mM) (Sigma-Aldrich). A reacção é iniciada pela adição deste agente complexante que ao reagir com ferro origina uma coloração magenta. O volume foi ajustado com etanol até perfazer 4 mL. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida á temperatura ambiente durante 10 minutos. A absorvância da solução foi medida espectrofotometricamente a 562 nm assim como a absorvâncias do controle (apenas Ferrozina e Cloreto de Ferro (II)). A percentagem de inibição da formação do complexo ferrozina Fe^{2+} foi dada pela equação:

$$(\%) \text{ de quelatização de metais} = [(A_0 - A_1) / A_0 * 100]$$

Onde, A_0 é a absorvância do controlo e A_1 a absorvância na presença de amostras.

Todas as determinações foram feitas em triplicado e as percentagens de quelatização de metais foram expressas como a média \pm desvio padrão da média (SD) das três repetições.

4.8.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor

O poder redutor das amostras foi determinado pelo método de Gülcin (2006). De cada uma das amostras foi retirado 1 mL e adicionado 2,5 mL de solução tampão fosfato (pH= 6,6 0,2 M) e 2,5 mL de solução aquosa de ferrocianeto de potássio (Sigma-aldrich). Após a agitação em vortéx, incubou-se a mistura a 50°C durante 30 minutos. Decorrido este período e adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (Sigma-aldrich) à mistura, sendo esta agitada em vortéx. Seguidamente foram recolhidos 2,5 mL da mistura para tubos de ensaio de 10 mL e adicionados 2,5 mL de água destilada. No ensaio do poder redutor, a presença de agentes redutores provoca a redução do complexo Fe³⁺/ferricianeto a uma forma ferrosa (Fe²⁺). Dessa forma, a formação de azul “Perl’s Prussian”, medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe²⁺.

Após a adição de cloreto de ferro (III) procedeu-se à leitura das absorvâncias em espectrofotómetro (U-2000, Itachi, Japão) para um comprimento de onda 700 nm. Tradicionalmente, neste método, os valores de absorvâncias medidos no espectrofotómetro a 700nm são suficientes para demonstrar a capacidade antioxidante das amostras. Não obstante, também é frequente usar um composto com atividade antioxidante conhecida e utilizá-lo como controlo para efetuar uma curva de calibração, que servirá para encontrar uma equação que permitirá expressar a atividade antioxidante como mg de equivalentes.g⁻¹ de peso seco. Foi o que optamos realizar neste ensaio.

Paralelamente à determinação do poder redutor dos diferentes extratos de pimento, efetuámos uma curva de calibração com diferentes concentrações de ácido ascórbico, um conhecido composto antioxidante, cuja equação encontrada foi a seguinte: $Y = 27,343 x - 0,2359$ ($R^2 = 0,9947$).

Esta equação serviu para expressar a atividade antioxidante do poder redutor em mg de equivalentes de ácido ascórbico.g⁻¹ peso seco.

4.8.5. Determinação da atividade antioxidante pelo método de descoloração do β -Caroteno/ácido linoleico

A metodologia aplicada na avaliação da atividade antioxidante segundo este método, foi baseada no modelo descrito por Selleh, 2012. Este método mede a atividade antioxidante de um dado extrato ou amostra pela capacidade desta em descolorar o complexo β -Caroteno/ácido linoleico. Previamente preparou-se uma emulsão de β -caroteno/ácido linoleico, adicionando-se 0,5 mg de β -caroteno (Sigma-Aldrich) em 1 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich). A mistura foi homogeneizada e transferiu-se 1 mL desta solução para um balão de fundo redondo contendo 25 μ L de ácido linoleico (Sigma-Aldrich) e 200 μ L de Tween 40 (Sigma-Aldrich). O clorofórmio da mistura foi evaporado em evaporador rotativo a 40°C. Após a evaporação, foi adicionada à mistura 100 mL de peróxido de hidrogénio (H₂O₂, Sigma-Aldrich). A mistura foi então agitada por forma a formar uma emulsão. Seguidamente foram a 500 μ L de extrato, preparado a uma concentração de 5 mg.mL⁻¹, adicionou-se 2,5 mL da emulsão. Para a determinação da atividade antioxidante foi necessária a medição das absorvâncias em dois tempos: logo após a mistura do extrato com a emulsão e após um período de incubação de 120 minutos a 50°C em banho-maria. As absorvâncias das amostras foram medidas a 470 nm em espectrofotómetro (UV-vis), contra o controlo (BHT e trolox).

A atividade antioxidante das amostras (percentagem de inibição, I%), foi determinada através da seguinte equação (Selleh, 2012):

$$I (\%) = (Abs_{\beta\text{-caroteno depois de 2h}} - Abs_{\beta\text{-Caroteno Inicial}}) * 100$$

Todas as determinações foram feitas em triplicado e as percentagens de inibição foram expressas como a média \pm desvio padrão da média (SD) das três repetições.

4.8.6. Determinação da atividade antioxidante pelo método de aprisionamento de radicais hidroxilo

A metodologia aplicada na determinação da atividade antioxidante pelo método de aprisionamento de radicais hidroxilo, foi baseada no modelo sugerido por Youwei *et al.* (2008). Com algumas modificações. Para tal a 0,1 mL de extracto a 5 mg.mL⁻¹ adicionou-se 0,15 mL de 2-deoxiribose (5 mM) (Sigma-Aldrich), 0,4 mL de solução

fosfato (0,75M, PBS, pH=7,4) (Sigma-Aldrich), 0,25 mL de água ultrapura, 0,1 mL de FeSO₄ (7,5 mM) (Sigma-Aldrich) e 0,1 mL de água oxigenada 1% (Sigma-Aldrich). A reação ocorre com a adição da água oxigenada. Esta mistura foi incubada durante 1 hora a 37°C. Decorrido este período, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 536 nm no espectrofotómetro UV-visível. A atividade antioxidante das amostras foi expressa em termos percentuais e a percentagem de aprisionamento de radicais hidroxilo foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{AARH \%} = [(Abs_{\text{Branco}} - Abs_{\text{Amostra}}) / Abs_{\text{Branco}}] * 100$$

Todas as determinações foram feitas em triplicado e as percentagens de inibição foram expressas como a média ± desvio padrão da média (SD) das três repetições.

4.9. Análise estatística

Todos os dados obtidos apresentam-se sob forma de média ± desvio padrão da média de ensaios efetuados em triplicado. Os valores obtidos foram submetidos a uma análise ANOVA, tendo as diferenças entre médias sido separadas pelo teste de Duncan para um nível de significância de $P < 0,05$. Foi ainda realizada uma análise de componentes principais (PCA). Nesta análise utilizaram-se os softwares SPSS, v.17 (SPSS-IBM, USA) e o JMP® v.7 (SAS, USA).

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante de diferentes espécies vegetais envolve compostos bioativos, como os polifenóis, inclusive os flavonóides, carotenoides, capsaicinóides, ácido ascórbico entre outros, presentes na composição química dos mesmo. Neste sentido o elevado ou reduzido potencial antioxidante dos diferentes extratos em estudo pode ser justificado pelo seu maior ou menor teor em compostos biativos. Assim, nas as seções seguintes encontram-se expressos os resultados para a composição química de diferentes variedades de pimentos do género *Capsicum* produzidas em Portugal bem como o potencial antioxidante deste hortícola e a possível relação entre a composição química e a atividade antioxidante.

5.1. Caracterização Química

5.1.1. Teor em fenóis totais e flavonóides totais.

Os compostos fenólicos englobam um grande número de fórmulas químicas 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. O teor em fenóis totais, expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de peso seco, encontrados para os extratos hexano, acetato de etilo, metanol 80% e metanol 100% das espécies *C. annuum* e *C. frutescens*, estão expressos na Tabela 7. Na Figura 5 está exemplificada a amostra de piri-piri com os diferentes solventes de extração utilizados para quantificação de fenóis totais, para posterior leitura espectrofotométrica e quantificação do teor de fenóis totais.

O solvente metanol foi o que mais se destacou na extração de fenóis totais, contudo, verificou-se que o hexano e o acetato de etilo são solventes pouco adequados para a extração destes compostos. No ponto de vista quantitativo o pimento vermelho e o pimento verde destacaram-se pelo elevado teor em fenóis totais, com 49,70 e 49,97 mg equivalentes de ácido gálico.g⁻¹ de peso seco, respetivamente, comparativamente às restantes amostras. Por outro lado, os extratos do pimento amarelo apresentaram concentrações mínimas, com teores médios compreendidos entre 2,22 e 27,06 mg

equivalentes de ácido gálico (GAE).g⁻¹ de peso seco, dependendo da natureza do solvente extrator.

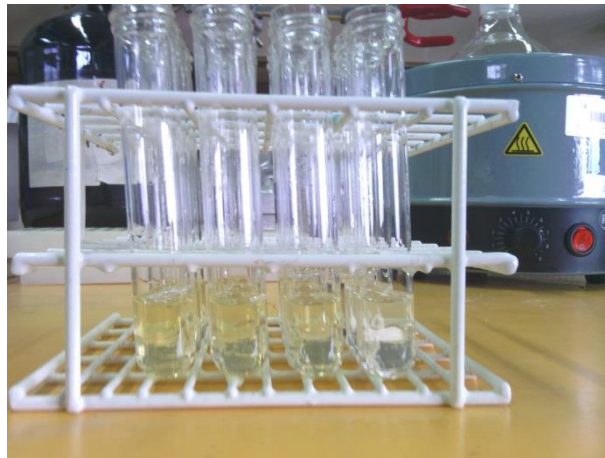


Figura 5. Amostra de piripiri nos diferentes solventes de extração, para posterior leitura espectrofotométrica e quantificação do teor em fenóis totais

Tabela 7. Teor em fenóis totais nas diferentes variedades em estudo.

Pimento	Concentração em mg equivalentes ácido gálico (GAE) .g ⁻¹ de peso seco*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	2,54±0,05 ^{aA}	4,62±0,27 ^{aC}	49,70±0,32 ^{cC}	27,70±0,19 ^{bA}
Vermelho italiano	2,52±0,06 ^{aA}	2,52±0,06 ^{aA}	32,32±0,49 ^{cA}	19,32±0,52 ^{bA}
Amarelo	2,22±0,12 ^{aA}	2,22±0,1 ^{aA}	26,54±0,19 ^{bA}	27,06±0,77 ^{bA}
Verde	2,96±0,39 ^{aA}	2,74±0,07 ^{aA}	49,97±4,26 ^{bC}	45,77±0,92 ^{bC}
Verde italiano	2,61±0,05 ^{aA}	3,23±0,4 ^{aA}	38,17±2,00 ^{bB}	32,17±1,48 ^{bB}
Verde padrão	3,70±0,02 ^{aB}	6,26±0,13 ^{aD}	33,930,93 ^{bA}	30,77±1,10 ^{bB}
Piripiri	8,61±0,80 ^{aC}	4,35±0,17 ^{aC}	24,42±2,31 ^{bA}	38,44±0,27 ^{bC}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas (p <0,05) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes (p <0,05) entre extratos.

Hassimoto *et al.* (2005), avaliando o teor em fenóis totais em diferentes espécies de vegetais encontraram em extratos metanólicos do pimento *C. annuum*, teores médios de 131 mg.g⁻¹ de peso seco, que são ligeiramente superiores aos encontrados neste

trabalho. De acordo com a literatura consultada e numa análise aos resultados da Tabela 7, verificamos que no presente estudo os teores de fenóis totais foram inferiores ao esperado. Contudo, Ranilla *et al.* (2010) avaliaram os parâmetros químicos e a atividade antioxidante dos frutos de *C. annuum*, e também constataram que apresentavam baixo teor destes compostos. Já Sun *et al.* (2007) relataram que a maior concentração de fenóis totais se encontra no pimento amarelo e laranja com 3,3 e 3,4 μmol equivalentes de catequina. g^{-1} de peso fresco respetivamente. Estes resultados são muito semelhantes aos já descritos anteriormente por Vision *et al.* (1998).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e a bibliografia consultada, há alguma discrepância no teor de fenóis totais observado, que podem ser devidas a diferentes aspetos como sejam as práticas culturais a que os pimentos estiveram sujeitos, a variedade, as condições ambientais, a idade da planta, o armazenamento, entre outros factores que já foram detalhadamente relatados em secções anteriores.

Da mesma forma, para a extração de flavonóides totais (Figura 6), analisando os resultados obtidos (Tabela 8), o metanol foi o solvente mais indicado para a extração destes compostos.

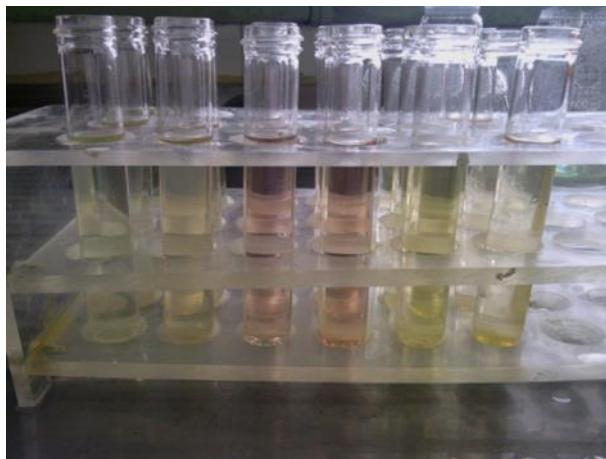


Figura 6. Alguns dos extratos preparados para posterior leitura espectrofotométrica para quantificação de flavonóides totais.

O teor de flavonóides totais foi máximo para o metanol nos extratos de pimento vermelho-italiano, pimento vermelho, com 6,07 e 4,89 mg de equivalentes de catequina. g^{-1} peso seco, respetivamente. Bea *et al.* (2012), também verificaram que o metanol é o solvente mais indicado para a extração destes polifenóis. Embora o teor de

flavonóides totais sejam comumente extraídos pelo metanol, para as amostras de pimento verde-padrão e piri-piri o acetato de etilo foi o solvente que mais se destacou. Foi observado um declínio na concentração de flavonóides no extrato de piri-piri comparativamente às restantes amostras. Contudo estes resultados são muitos semelhantes aos relatados por Bae *et al.* (2012). Os mesmos autores identificaram e quantificaram os flavonóides totais presentes em diferentes espécies de pimentos e concluíram que o teor mínimo limite era 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. A baixa concentração de flavonóides pode ser justificada pelo desvio de precursores fenólicos para capsaicinóides (Howard *et al.*, 2000).

Tabela 8. Resultados para a quantificação de flavonóides totais, presentes nas diferentes variedades de pimento em estudo.

Pimento	Concentração em mg de equivalentes de catequina (CAE). g^{-1} de peso seco*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	1,70 \pm 0,25 ^{ab}	2,87 \pm 0,25 ^{bc}	2,72 \pm 0,30 ^{bb}	4,89 \pm 0,04 ^{cd}
Vermelho italiano	1,43 \pm 0,14 ^{ab}	1,34 \pm 0,12 ^{ab}	6,07 \pm 1,82 ^{cd}	3,49 \pm 0,27 ^{bc}
Amarelo	0,75 \pm 0,06 ^{ba}	0,41 \pm 0,01 ^{aa}	2,58 \pm 0,16 ^{cb}	2,97 \pm 0,01 ^{cb}
Verde	0,69 \pm 0,29 ^{aa}	2,02 \pm 0,03 ^{bb}	4,47 \pm 0,52 ^{dc}	3,50 \pm 0,03 ^{cc}
Verde italiano	2,31 \pm 0,03 ^{ac}	2,72 \pm 0,05 ^{bc}	4,99 \pm 0,06 ^{cc}	2,80 \pm 0,04 ^{bb}
Verde padrão	1,88 \pm 0,01 ^{cb}	1,93 \pm 0,02 ^{cb}	0,37 \pm 0,02 ^{ba}	0,65 \pm 0,02 ^{aa}
Piripiri	0,39 \pm 0,22 ^{aa}	1,18 \pm 0,64 ^{ca}	0,91 \pm 0,56 ^{ca}	0,15 \pm 0,01 ^{ba}

*Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

Além da quantificação do teor em fenóis e flavonóides totais procedeu-se á caracterização individual dos compostos fenólicos existentes nos frutos *Capsicum*, analisadas por HPLC-UV/DAD de acordo com as condições descritas em 4.6. e cujos cromatogramas tipo se apresentam nas Figuras 7, 8 e 9. A quantificação dos compostos fenólicos individuais revelou diferenças entre as variedades analisadas. Algumas das amostras apresentaram reduções apreciáveis a nível dos compostos fenólicos dificultando a sua identificação e quantificação (Tabela 9). De acordo com os resultados

obtidos todas as amostras apresentaram ácido gálico como constituinte maioritário, há exceção do piri-piri, com destaque para a luteolina. Por outro lado, o ácido clorogénico apenas foi detetado na amostra de pimento verde padrão, com $34,34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. O pimento verde padrão apresentou consideráveis teores em quercetina, com $26,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Contudo a luteolina também se destacou, com $13,16 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ de peso seco. A concentração mínima de quercetina corresponde ao extrato de pimento vermelho, com teores mínimos de apenas $1,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Também o pimento vermelho-italiano apresentou concentrações muito similares à do pimento vermelho (Tabela 9).

Tabela 9. Fenólicos individuais identificados, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco.

	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco) *			
	Ácido clorogénico	Ácido gálico	Luteolina	Quercetina
Vermelho	n.d	$59,34\pm 1,7$	n.d	$1,30\pm 0,2$
Vermelho italiano	n.d	$60,65\pm 4,5$	n.d	$1,65\pm 0,2$
Amarelo	n.d	$42,34\pm 3,7$	n.d	$10,63\pm 0,4$
Verde	n.d	$55,78\pm 2,6$	n.d	$4,64\pm 0,4$
Verde italiano	n.d	$42,20\pm 4,2$	n.d	$5,08\pm 0,5$
Verde padrão	$34,34\pm 3,1$	$6,00\pm 0,5$	$13,16\pm 2,2$	$26,12\pm 0,44$
Piripiri	n.d	n.d	$10,12\pm 0,2$	$1,68\pm 0,2$

*Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios.

Os dados obtidos, confirmam os resultados encontrados por outros autores para outras variedades de pimento, ainda que com ligeiras diferenças nos teores encontrados. Sun *et al.* (2007), também avaliaram a concentração dos compostos fenólicos individuais luteolina e quercetina, em pimentos de diferentes colorações (vermelho, verde, amarelo e laranja) e constataram que o teor de quercetina no pimento vermelho é significativamente maior comparativamente aos restantes extratos, com valores médios de $34,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Por outro lado, e segundo os mesmos autores, o teor de luteolina foi máximo no pimento vermelho, seguido por amarelo e por último o pimento laranja. O pimento verde apresentou a menor quantidade de luteolina, cerca de um quinto do teor presente no pimento vermelho.

Outros compostos derivados dos flavonóides quercetina, luteolina e miricetina foram descritos por Howard *et al.* (2000) e Sun *et al.* (2007) no pimento, nomeadamente: ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, cafeico e sinápico, luteolina-7-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, miricetina-3-*O*-ramnósido, quercetina-3-*O*-ramnósido e luteolina-7-*O*-(2-apiosil-6-malonil)-glucósido. Os derivados da quercetina e da luteolina têm nos frutos um efeito protetor contra a foto oxidação causada pela radiação UV (Stefanelli *et al.*, 2010). Além disso, e como já foi referido anteriormente, estes compostos apresentam uma diversidade de atividades biológicas. A miricetina também tem revelado capacidade anticancerígena (Lu *et al.*, 2006) e antioxidante (Moure *et al.*, 2001).

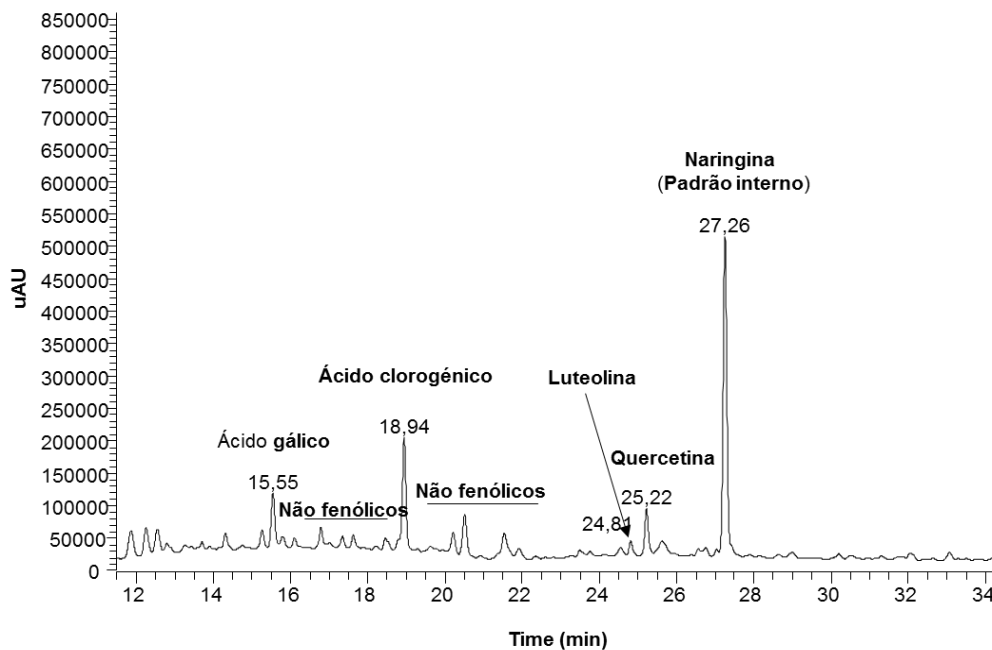


Figura 7. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 280 nm.

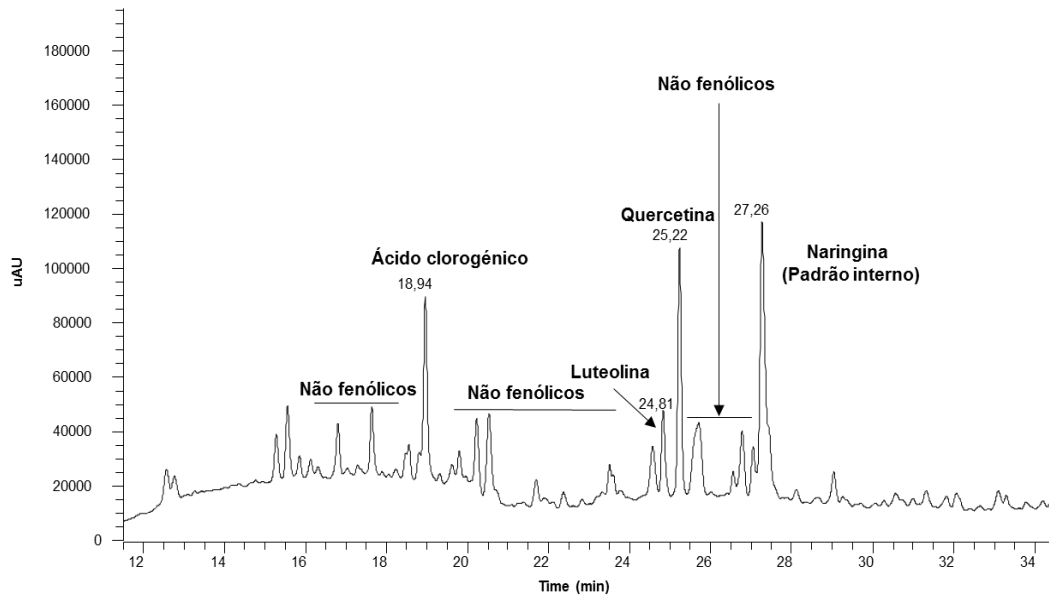


Figura 8. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 320 nm.

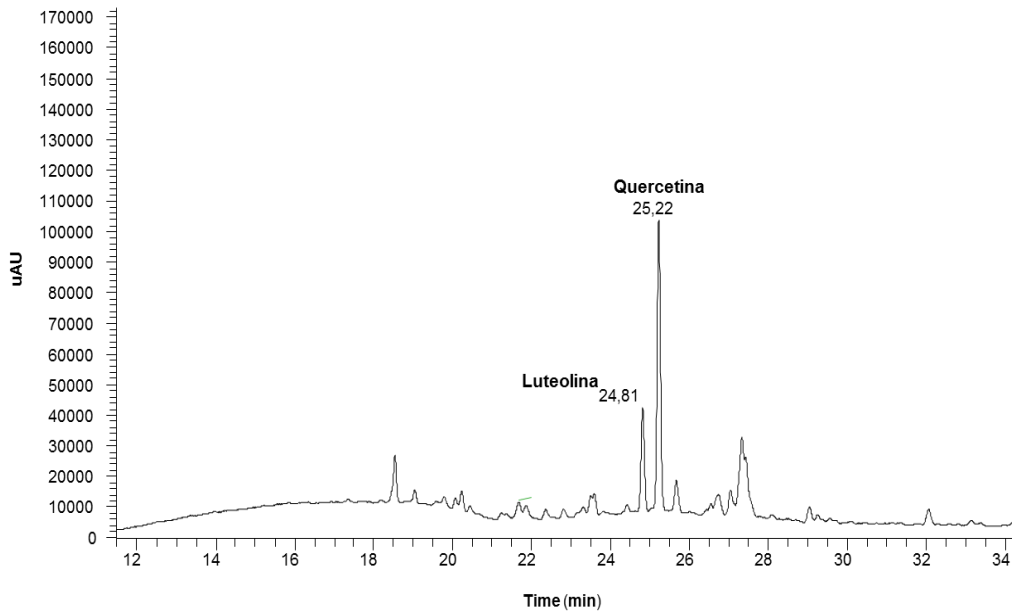


Figura 9. Perfil cromatográfico de fenólicos individuais do pimento verde-padrão obtido por HPLC-UV/DAD a 370 nm.

5.1.2. Carotenoides totais

A presença de pigmentos nos tecidos vegetais dá cor a legumes e frutas, que é diferente dependendo do genótipo e da espécie. Os pigmentos são substâncias com diferentes estruturas químicas, que estão presentes sob a forma de pigmentos de porfirina, carotenoides, antocianinas e flavonas (Costache *et al.*, 2012).

O grupo dos carotenoides e os seus derivados incluem cerca de 70 compostos presentes na maioria das frutas e legumes. Entre os carotenoides com 40 átomos de carbono identificados em frutas e legumes, o β -caroteno é o mais popular e difundido. Contudo, o licopeno tem sido amplamente identificado em produtos hortícolas. Tal como no pimento, também o tomate tem sido alvo de vários estudos, devido ao potencial em licopeno e β -caroteno. O teor total em carotenoides no tomate varia entre os 6,55 e os 12,0 mg. g⁻¹ de peso fresco. No pimento o intervalo relatado é ligeiramente maior, com variações entre 8,0 e 25,0 mg. g⁻¹ de peso fresco (Costache *et al.*, 2012).

Na Figura 10 estão representados os extratos preparados para leitura espectrofotométrica, para posterior quantificação de carotenoides totais.

Nas Figuras 11 e 12 estão expressos os resultados relativos ao teor de carotenoides totais em função do solvente de extração.

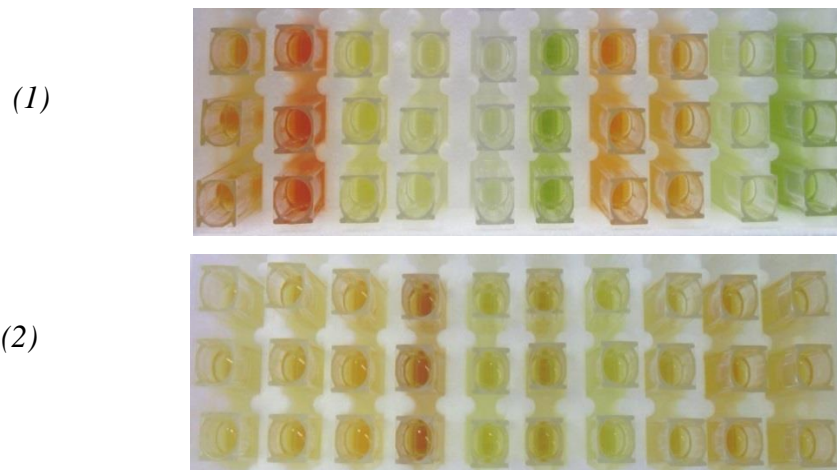


Figura 10. Amostras dos diferentes pimentos em estudo, preparadas para posterior leitura espectrofotométrica, com os respetivos solventes de extração (1) Solventes hexano e acetato de etilo; (2) Solventes metanol 100% e metanol 80%.

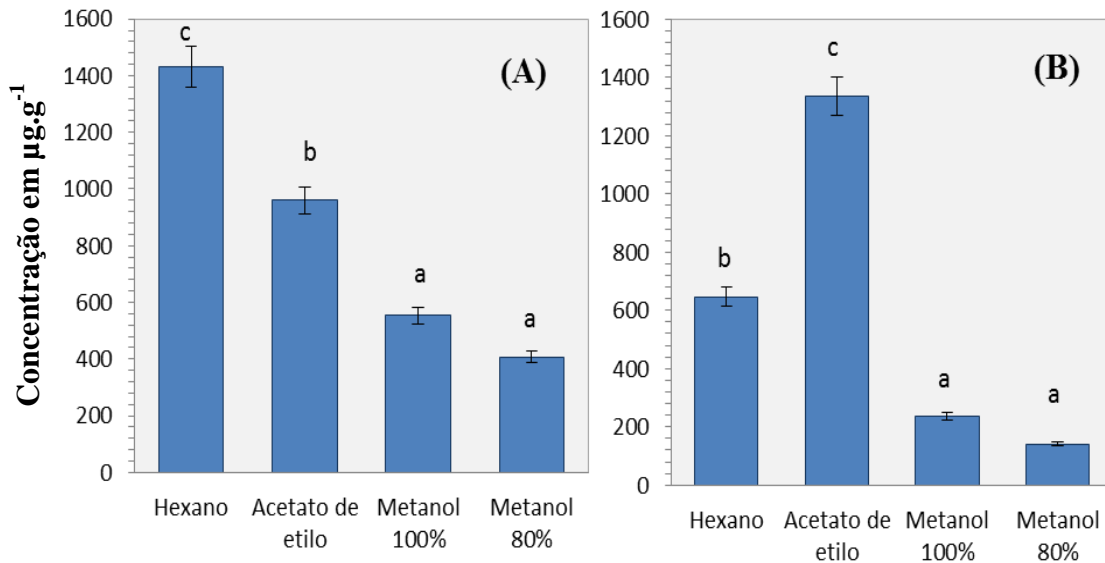


Figura 11. Teor máximo de carotenoides totais expresso em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco para as amostras: (A) pimento verde padrão e (B) piri-piri. Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, o teor de carotenoides totais foi máximo para os extratos de pimento verde-padrão e piri-piri respetivamente (Figura 11). Para a extração de carotenoides totais, o hexano e o acetato de etilo foram os solventes que melhor quantificaram estes pigmentos. O pimento verde-padrão destacou-se pelo elevado teor de carotenoides totais, com $1432,18 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco para a extração em hexano, seguido o piri-piri que apresentou valores muito semelhantes, com $1335,39 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso, para o solvente acetato de etilo. Também o pimento vermelho, pimento vermelho-italiano e pimento verde apresentaram elevados teores em carotenoides, compreendidos entre $1000 \leq \text{Teor} (\mu\text{g.g}^{-1}) \leq 1120$. Em contrapartida, no fruto do pimento amarelo e pimento verde italiano foram encontrados valores mínimos. Os resultados obtidos, em função do solvente, estão especificados na Figura 12. Nazzaro *et al.* (2009) avaliaram o conteúdo de alguns componentes bioativos em duas variedades de pimento e constataram que os valores de carotenoides totais das espécies *C. annuum* eram muito semelhantes aos valores encontrados na espécie *C. frutescens*, com $3190,0 \mu\text{g.100 g}^{-1}$ e $3350,0 \mu\text{g.100 g}^{-1}$ respetivamente. Por outro lado, Topuz & Ozdemir (2007), detetaram em variedades de pimento (*C. annuum*), através de cromatografia líquida de alta eficiência a concentração de carotenoides com teores compreendidos entre $2310,0-2390,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco, ligeiramente superiores aos detetados nos nossos extratos.

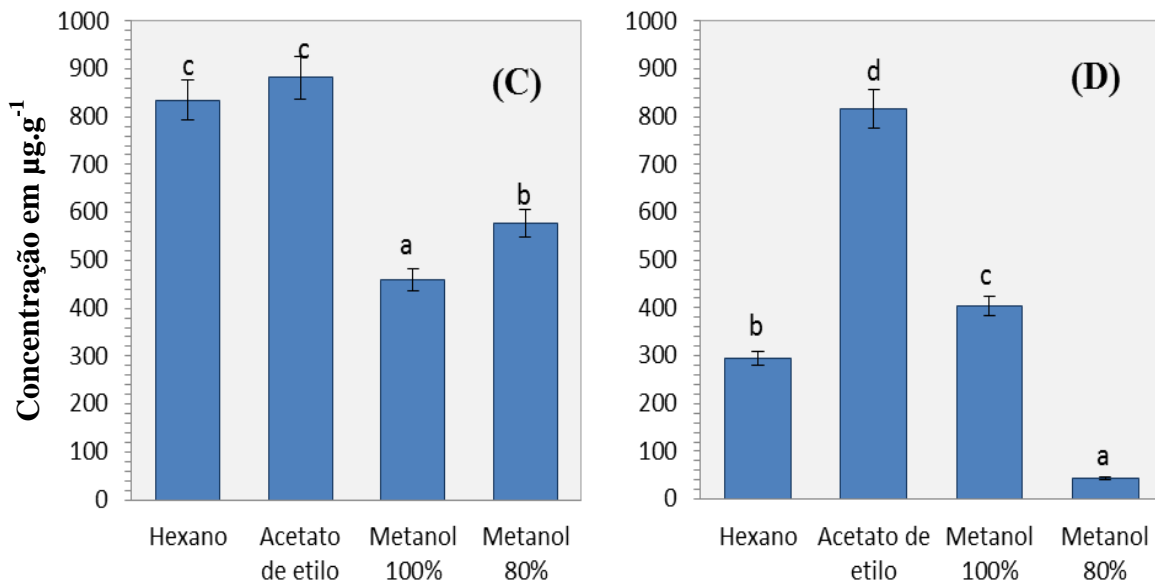


Figura 12. Teor de carotenoides totais expresso em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco para as amostras: (C) pimento amarelo e (D) verde-italiano. Valores expressos em média \pm desvio padrão de três ensaios. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Numa análise aos resultados da Figura 12, constatou-se que o pimento amarelo apresentou $881,98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, seguido do pimento verde-italiano, com $816,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de peso seco. Estes foram os teores mínimos encontrados no fruto do pimento.

Segundo um estudo recente de Bae *et al.* (2012), em diferentes variedades de pimentos da espécie *C. annuum* constataram que o hexano é o solvente mais indicado para a extração de carotenoides, extraíndo o máximo, com $722 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Segundo o mesmo autor, o metanol não é um solvente indicado para a extração de carotenoides. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo. Howard *et al.* (2000), ao quantificar os carotenoides 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 todos os pimentos aumentaram extensivamente com a maturação, e juntamente verificaram que a atividade antioxidante destes pimentos também aumentou. Os carotenoides capsorubina e a capsantina também têm sido descritos como compostos de extrema importância na composição do pimento, uma vez que constituem 30 a 60% do total de carotenoides dos frutos inteiramente maduros (Matsufuji *et al.*, 1998).

Estudos revelam que durante o processo de amadurecimento do pimento verde o teor de carotenoides tende a diminuir. Em contrapartida, no pimento vermelho, durante o amadurecimento do fruto o teor total destes compostos tendem a aumentar (Sun *et al.*,

2007). Relativamente à clorofila a e b, presentes amostras em estudo, os resultados encontram-se expressos na Tabela 10. Comparando os resultados dos quatros solventes de extração, os melhores resultados obtiveram-se com o metanol 100% e acetato de etilo. Tal como era esperado, o pimento verde destacou-se pelo elevado teor de clorofila a e b comparativamente às restantes amostras, com 9,82 e 13,84 $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco, respectivamente. De acordo com a bibliografia disponível a coloração verde dos pimentos é uma característica típica das clorofilas. O pimento vermelho italiano também apresentou elevados teores de clorofila b, com 15,68 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco. Por outro lado, os teores de clorofila a foram pouco significativos. Estes resultados são muito semelhantes aos descritos por Costache et al., 2012.

Os teores relativos á amostra de piripiri encontram-se representados na Figura 13. Os teores mínimos de clorofilas foram detetados no extrato de piripiri. A respetiva amostra apresentou concentrações mínimas de clorofila b, não permitindo a quantificação. No entanto, para a clorofila a, o solvente metanol 80 % foi o mais indicado para a extração deste pigmento, com 5,11 $\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco. Contrariamente ao metanol 80% o hexano foi o solvente menos indicado para extração. Por outro lado, também o metanol 100% extraiu concentrações relativamente baixas com 0,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Os resultados obtidos para o teor de clorofila a, em função do solvente de extração para a amostra de piripiri, estão esquematizados na Figura 13.

Tabela 10. Resultados expresso em $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ peso seco, de clorofilas existentes nos pimentos em estudo de acordo com o solvente de extração.

Pimento	Solvente de extração	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>
Vermelho	Hexano	0,59±0,01	0,93±0,01
	Acetato de etilo	0,58±0,03	0,84±0,03
	Metanol 100%	3,78±1,18	7,72±1,80
	Metanol 80%	0,90±0,00	2,01±0,00
Vermelho-Italiano	Hexano	0,76±0,06	15,68±1,07
	Acetato de etilo	0,71±0,06	1,10±0,08
	Metanol 100%	0,55±0,01	1,05±1,24
	Metanol 80%	0,51±0,00	1,05±0,00
Amarelo	Hexano	7,85±0,11	12,31±0,21
	Aceto de etilo	4,92±0,43	7,01±0,60
	Metanol 100%	2,06±0,34	3,97±0,69
	Metanol 80%	3,27±0,58	0,55±0,74
Verde	Hexano	1,82±0,23	2,49±0,37
	Acetato de etilo	9,82±1,75	13,84±2,49
	Metanol 100%	4,04±0,25	7,71±0,48
	Metanol 80%	3,10±0,03	5,93±0,57
Verde Italiano	Hexano	1,03±0,13	1,12±0,20
	Acetato de etilo	7,61±0,69	9,71±0,26
	Metanol 100%	0,81±0,02	1,55±0,03
	Metanol 80%	0,63±0,01	1,38±0,01
Verde Padrão	Hexano	4,86±0,00	2,27±0,00
	Acetato de etilo	4,82±0,00	4,48±0,00
	Metanol 100%	4,11±0,00	7,88±0,00
	Metanol 80%	1,53±0,00	3,09±0,00

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios

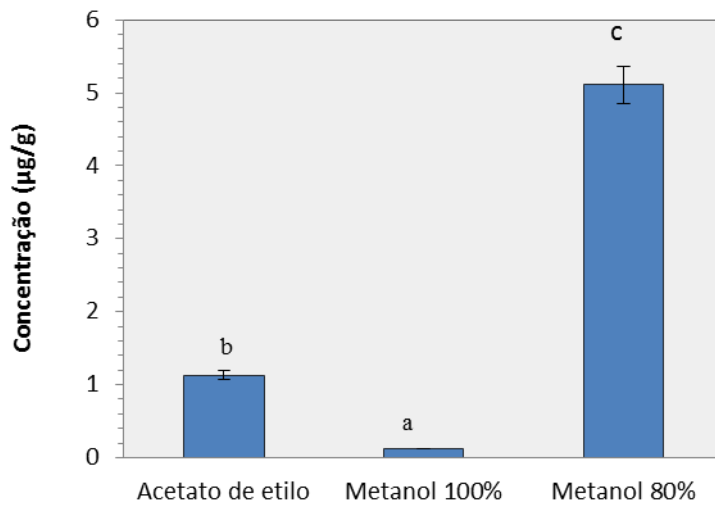


Figura 13. Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) de clorofila a, na amostra de piri-piri de acordo com o solvente de extração.

5.1.3. Quantificação β - Caroteno

Para o estudo da concentração de β -caroteno, procedeu-se à análise das amostras por HPLC-UV/DAD. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração de β - caroteno nas amostras de pimento em estudo

Pimento	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco)*
	<i>β- Caroteno</i>
Vermelho	0,476±0,10
Vermelho Italiano	0,335±0,03
Amarelo	0,095±0,03
Verde	0,706±0,11
Verde Italiano	0,259±0,02
Verde Padrão	1,156±0,07
Piripiri	0,996±0,07

*Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios

A concentração de β -caroteno nas diferentes variedades em estudo variou de 0,095-1,156 mg. g⁻¹ de peso seco. Do ponto de vista quantitativo, o pimento verde padrão destacou-se pela excelente fonte de β -caroteno, com 1,156 mg. g⁻¹ de peso seco. Por outro lado, o pimento amarelo registou teores mínimos, com 0,095 mg. g⁻¹ de seco fresco (Tabela 11).

Sun *et al.* (2007) constataram que o pimento verde contém teor médio de β -caroteno com 5,8 μ g.g⁻¹ peso fresco. Por outro lado, concluíram que o pimento amarelo apresenta teores mínimos, com apenas 0,2 μ g.g⁻¹ peso fresco. O mesmo se comprovou no presente estudo embora os teores de β -caroteno para a amostra do pimento amarelo sejam ligeiramente abaixo dos valores relatados por estes autores. Bae *et al.* (2012) quantificaram o teor dos β -caroteno e capsantina em diferentes variedades de pimentos e constataram que o limite mínimo de detecção para os carotenoides capsantina e β -caroteno, com 0,24 e 0,21 μ g.g⁻¹ de peso fresco, respetivamente.

O perfil cromatográfico das amostras do pimento amarelo, vermelho e verde encontram-se respetivamente esquematizados nas Figuras 14, 15 e 16.

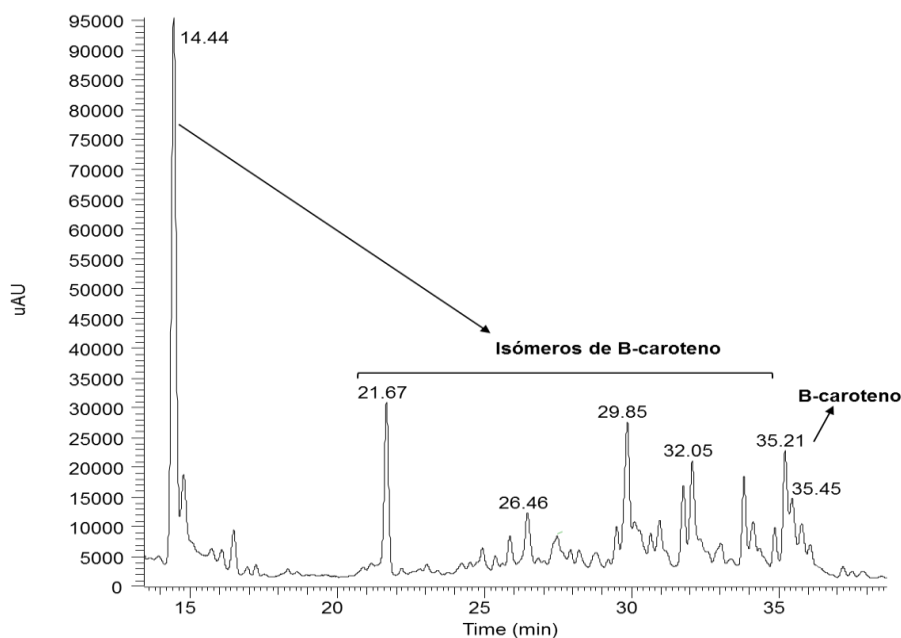


Figura 14. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento amarelo obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.

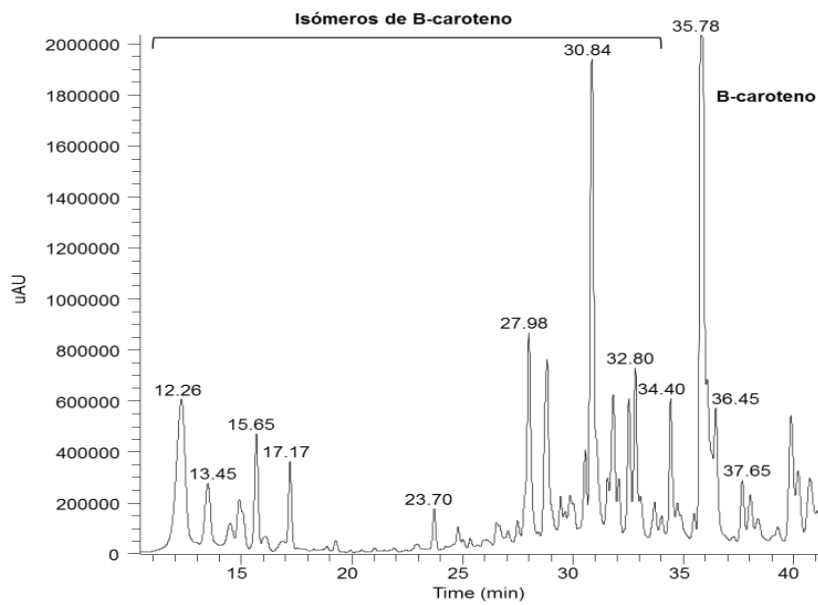


Figura 15. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento vermelho obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.

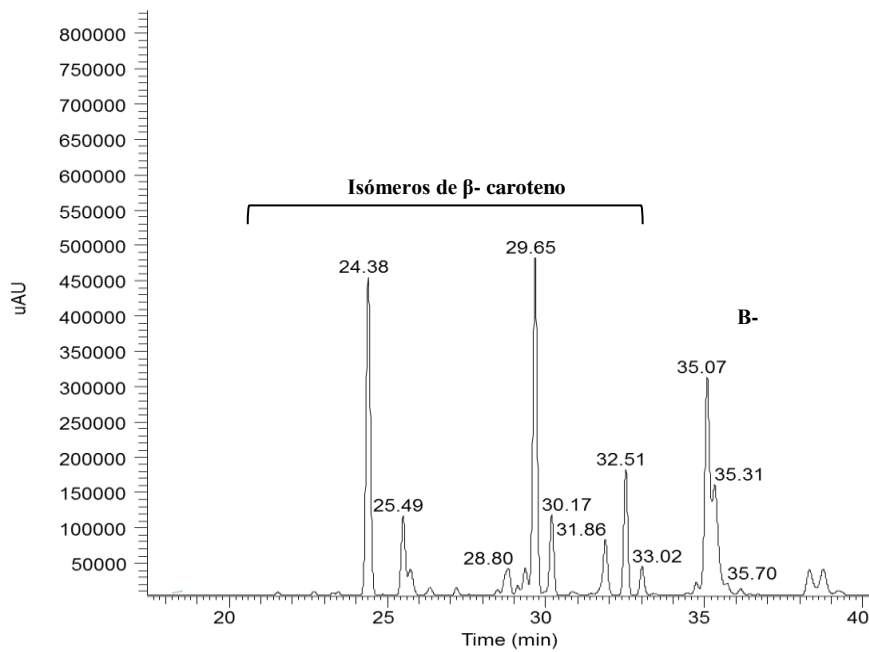


Figura 16. Perfil cromatográfico do β -caroteno do pimento verde obtido por HPLC-UV/DAD a 540 nm.

5.1.4. Capsaicinóides

Os capsaicinóides são alcalóides não voláteis, responsáveis pela pungência das espécies *Capsicum*. Os parâmetros que diferenciam entre os capsaicinóides são: (I) o comprimento da cadeia lateral alifática, (II) a presença ou ausência de uma ligação dupla, (III) o ponto de ramificação e (IV) a sua relação relativamente à pungência. Na Figura 17 está representada a estrutura química dos principais capsaicinóides de fruto *Capsicum*.

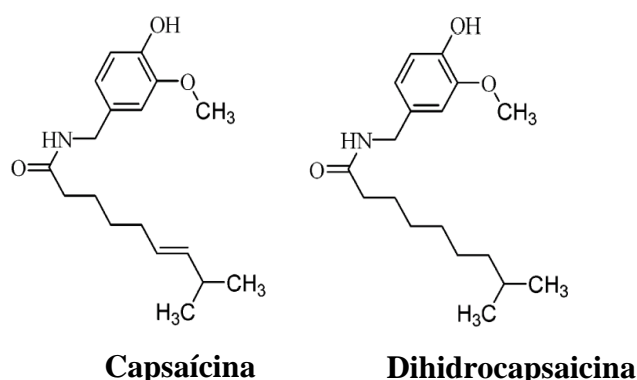


Figura 17. Estrutura química dos principais alcalóides do fruto *Capsicum*.

Geralmente, a capsaicina e dihidrocapsaicina são responsáveis por 90 % da pungência do fruto do pimento (Madhumathy *et al.*, 2007). Estes alcalóides estão presentes em maiores quantidades nas variedades caracterizadas por uma forte pungência (Perucka & Oleszek, 2000; Kozukue *et al.*, 2005; Meghvansi *et al.*, 2010). Contudo, estes alcalóides também apresentam atividade antioxidante interessante, pois inibem a peroxidação dos lípidos, apresentando um desempenho comparável ao tocoferol, luteolina e BHT (Rosa *et al.*, 2002). No entanto, existe grande variação na concentração de capsaicinóides nos frutos de distintas espécies e entre génotipos da mesma espécie. Além disso, o seu teor depende do estágio de desenvolvimento do fruto, ocorrendo uma acumulação no início do amadurecimento e decréscimo no estágio do mesmo (Perucka & Oleszek, 2000; Kozukue *et al.*, 2005; Meghvansi *et al.*, 2010).

As determinações de capsaicinóides nas amostras foram obtidas por HPLC-UV/DAD. As variedades analisadas neste estudo, excetuando o piri-piri comercial,

apresentaram valores residuais de capsaicinóides, aliás inferiores ao limite de deteção do HPLC (Figura 18).

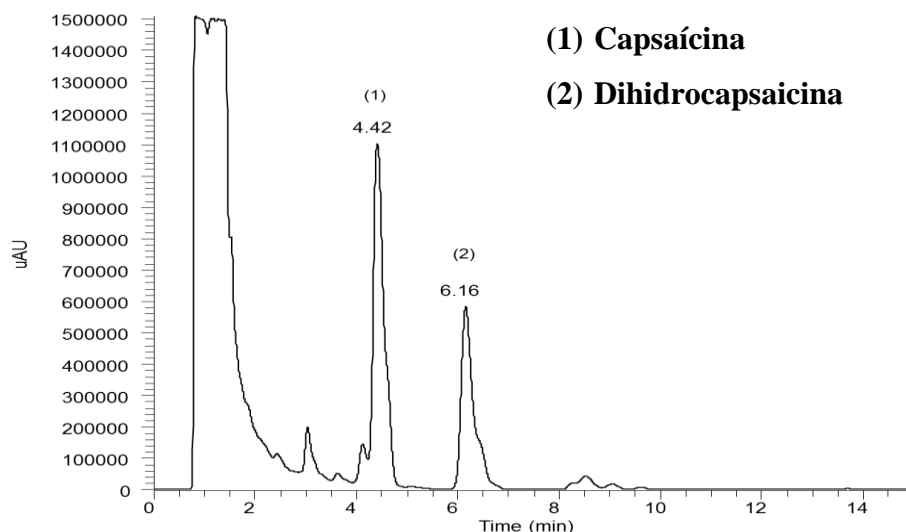


Figura 18. Perfil cromatográfico dos capsaicinóides, (1) capsaïcina e (2) dihidrocapsaicina na amostra piri-piri, obtido por HPLC-UV-/DAD a 222 nm.

Numa análise ao cromatograma da Figura 18, correspondente á amostra de piri-piri, extraiu-se respetivamente dois alcalóides: capsaïcina (1) e a dihidrocapsaicina (2). O cromatograma revela que os alcalóides capsaïcina e dihidrocapsaicina são eluídos a 4,42 e 6,16 min, respetivamente, com deteção a 222,5 nm. A concentração de capsaïcina presente na solução padrão do piri-piri foi de $17571,24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. por outro lado, a dihidrocapsaicina apresentou quantidades reduzidas, apenas $41,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (Tabela 12). Estes valores parecem confirmar dados obtidos por outros autores, que descrevem a capsaïcina como sendo o alcalóide predominante no fruto do pimento (Kozukue *et al.*, 2005; Chinn *et al.*, 2010). Recentemente Hayaman & Kam, (2008) e Dewick *et al.* (2009), definiram a capsaïcina como o alcalóide predominante no pimento (70%) seguida da dihidrocapsaicina (20%), nordihidrocapsaicina (7%), homocapsaicina (1%) e homodihidrocapsaicina (1%).

Othman *et al.* (2011) quantificaram os alcalóides presentes no fruto *C. annuum* e *C. frutescens* e verificaram que os alcalóides capsaïcina e dihidrocapsaicina apresentaram teores médios de $4294,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco e $4482,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco ($67984,60$ SHU) respetivamente, caracterizando-os como altamente pungentes. No entanto, também detetaram teores mínimos do alcalóide capsaïcina na amostra de

pimento verde, com $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Já Diaz *et al.* (2004) reportam que por vezes ocorre uma diminuição nos teores em capsaicinóides devido à provável oxidação destes compostos durante o processo de amadurecimento do fruto. Aliás, anteriormente Govindarajan *et al.* (1987) determinaram que para algumas espécies de pimentos de *C. baccatum* e *C. pubescens* a concentração capsaicinóides foi muito diminuta, cerca de 0,106 a 0,358%, enquanto para *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* os valores formam já ligeiramente superiores, mas ainda assim baixos: entre 0,098 a 1,477 % para *C. annuum* e entre 0,264 a 1,218 % para *C. frutescens* e *C. chinense*. Uma das razões apontadas por estes autores terá sido a degradação dos capsaicinóides por oxidação.

Tabela 12. Resultado para a concentração de capsaicina e dihidrocapsaicina, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco. Classificação da pungência do piri-piri em Unidades de calor Scoville.*

	Capsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Dihidrocapsaicina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Scoville heat units (SHU)	Nível de pungência
Piri-piri	17571,24 \pm 2,350	41,7 \pm 0,004	280 322,16	Altamente pungente

*Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios

De acordo com a classificação descrita, a pungência dos pimentos em estudo foi avaliada da seguinte forma: piri-piri altamente pungente e as restantes amostras (pimento verde italiano, pimento verde padrão, pimento verde, pimento amarelo, pimento vermelho, pimento vermelho italiano) como não pungentes. Alguns estudos mostram que os pimentos cultivados na primavera-verão são mais pungentes que as do outono-inverno. Tal fenómeno ocorre devido ao *stress* que influencia a via dos fenilpropanóides e afeta indiretamente a síntese de capsaicinóides (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002). No entanto, tal não é possível asseverar com estes resultados uma vez que não se comparou pimentos produzidos em diferentes épocas.

5.1.5. Teor em vitamina C

Por ser um nutriente com comprovada ação antioxidante, o mais potente e o menos tóxico dos antioxidantes naturais, a vitamina C (ácido ascórbico) têm sido alvo de vários estudos. O alto teor de ácido ascórbico no pimento é uma de suas qualidades nutricionais primárias. Por exemplo, de acordo com Lee & Kade (2000), o consumo de 100 g de peso fresco de pimentos fornece entre 100 e 200 % da ingestão diária

recomendada de ácido ascórbico. A quantificação do teor de ácido ascórbico foi determinada de acordo com a secção 4.4 e cuja ilustração se apresenta na Figura 19.



Figura 19. Amostras preparadas previamente para leitura espectrofotométrica após a reação redox.

Na Tabela 13 são apresentados os teores médios de ácido ascórbico obtido nas diferentes variedades em estudo. Os teores médios variaram entre 0,49-0,64 mg.g⁻¹ de peso seco. A amostra de pimento verde-padrão foi a que apresentou teores em ácido ascórbico mais elevado (0,64 mg.g⁻¹ peso seco). Em contrapartida, o pimento vermelho apresentou teores mínimos (0,49 mg.g⁻¹ peso seco).

Tabela 13. Concentração de ácido ascórbico (mg.g⁻¹ peso seco) nas diferentes amostras de pimentos.

Teor de Vitamina C (mg.g ⁻¹ peso seco) ^{*,**}						
Vermelho	Vermelho italiano	Amarelo	Verde	Verde padrão	Verde italiano	Piripiri
0,49±0,02 ^a	0,50±0,01 ^a	0,56±0,01 ^b	0,59±0,01 ^c	0,64±0,01 ^d	0,62±0,01 ^d	n.d ***

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios

**Na mesma linha, letras diferentes correspondem a diferenças significativas (p <0,05) entre as diferentes variedades de pimento.

*** não detetado

Recentemente, Nazzaro *et al.* (2009), ao avaliarem duas variedades de pimento doce da espécie *C. annuum* L. detetaram 7,9 mg. g⁻¹ de peso seco, valores acima dos constatados no presente estudo. Comparando com os resultados de outros autores (Howard *et al.*, 2000), verificou-se que as amostras em estudo apresentaram teores de ácido ascórbico relativamente baixos. Várias poderão ter sido as razões, desde o modo de produção até às condições de determinação da vitamina C que para o corrente caso,

forma espectrofotométrica, e por isso talvez seja um método menos eficiente e reprodutível. Outros métodos como o HPLC serão mais fidedignos. Outros estudos revelam que a intensidade da luz estimula o aumento das concentrações de ácido ascórbico e glicose no fruto do pimento (Osuna- Garcia *et al.*, 1998). Por outro lado, Rahman *et al.* (1978), Howard *et al.* (1994), Osuna-Garcia *et al.* (1998) e Lee (2000) comprovam que o teor de vitamina C tende a aumentar com o estado de amadurecimento do fruto. Zhang *et al.* (2003) avaliaram o teor de ácido ascórbico de diferentes genótipos da espécie *C. annuum* e verificaram que o pimento vermelho apresenta teores mais elevados de vitamina C em relação ao pimento verde.

5.2.- Atividade antioxidante

Nos últimos tempos, diversos trabalhos têm-se focado no estudo do perfil de compostos bioativos em diferentes géneros de vegetais, entre os quais do género *Capsicum*, com o objetivo de avaliar quais os que apresentam naturalmente elevada atividade antioxidante (Marino *et al.*, 2006). Alguns destes estudos, têm referenciado o pimento como uma excelente fonte de compostos bioativos com capacidade antioxidante (Deepa *et al.*, 2007). É também neste contexto que surge este trabalho. O termo “antioxidante” será utilizado para abordar as seguintes atividades: ação anti-radicalar (atividade de sequestrar os radicais livres) e a ação antioxidante (atividade de prevenir ou retardar a oxidação lipídica). Nas seções seguintes encontram-se expressos os resultados relativos ao potencial antioxidante dos extratos de pimentos em estudo segundo diferentes métodos: (i) efeito bloqueador de radicais livres DPPH, (ii) captura do radical livre ABTS+, (iii) Inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, (iv) aprisionamento de radicais hidroxilo, (v) quelatização de metais e (vi) poder redutor.

5.2.1. Efeito bloqueador de radicais livres DPPH

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante através do efeito bloqueador de radicais livres DPPH foram descritos em atividade antioxidante (AA%). Na Figura 20 ilustra a mistura resultante para posterior leitura espectrofotométrica em leitor de

microplacas para avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos pelo método do efeito bloqueador de radicais livres DPPH.



Figura 20-Mistura resultante para posterior leitura espectrofotométrica para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Os resultados encontram-se expressos na Tabela 14 em função da eficiência dos solventes de extração (hexano, acetato de etilo, metanol 100% e metanol 80%).

Tabela 14. Resultados da atividade antioxidante (% AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração, através do efeito bloqueador de radicais livres DPPH.

Pimento	% AA*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	8,57±0,15 ^{cC}	74,78±0,66 ^{bB}	58,12±3,46 ^{aA}	87,52±0,15 ^{cD}
Vermelho italiano	85,08±0,69 ^{cB}	84,12±0,75 ^{cC}	72,34±1,89 ^{bB}	67,80±0,69 ^{aA}
Amarelo	86,02±0,43 ^{cB}	84,38±0,40 ^{cC}	74,69±0,84 ^{bB}	70,50±1,44 ^{aA}
Verde	72,68±0,15 ^{aA}	85,25±0,84 ^{cD}	80,19±1,21 ^{bC}	79,49±0,30 ^{bB}
Verde italiano	87,35±0,30 ^{cC}	81,36±3,42 ^{bC}	81,41±0,26 ^{aC}	80,23±0,40 ^{aB}
Verde padrão	85,43±0,66 ^{cB}	83,68±0,15 ^{bC}	82,02±0,15 ^{aD}	81,15±0,26 ^{aC}
Piripiri	71,20±2,9 ^{bA}	57,94±1,49 ^{aA}	78,88±1,49 ^{cC}	79,84±2,24 ^{cC}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

.De acordo com os resultados (Tabela 14), verificámos que de um modo geral a atividade antioxidante foi variável em função do tipo de solvente usado na extração e

tipo de variedade de pimento, ainda que por vezes as diferenças entre os teores médios não tenham sido significativamente diferentes ($p < 0,05$). O metanol 100% demonstrou ser menos eficaz que todos os outros e o hexano demonstrou, neste caso, ser o mais adequado. Apesar destas diferenças, constatou-se que os extratos têm um comportamento bastante similar na interceção do radical DPPH. No entanto, segundo os dados obtidos, o pimento vermelho apresentou maior poder antioxidante com variações médias entre os 58 e os 88 % de atividade antioxidante (Tabela 14).

5.2.2. Captura do radical livre *ABTS*⁺

O método ABTS apresenta algumas vantagens relativamente ao método do DPPH, pois é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, enquanto o DPPH só pode dissolver-se em meio orgânico.

Os resultados relativos à atividade antioxidante pelo método do ABTS, encontram-se expressos em % de inibição na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados da atividade antioxidante (% inibição) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração, através da captura do radical livre *ABTS*⁺

Pimento	% Inibição*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	39,21±1,65 ^{aC}	76,50±2,40 ^{cC}	74,94±0,75 ^{bC}	79,26±0,42 ^{cD}
Vermelho italiano	11,03±1,36 ^{aB}	19,66±5,71 ^{bA}	51,80±5,58 ^{cA}	62,47±10,11 ^{dC}
Amarelo	5,52±1,66 ^{aA}	42,81±1,30 ^{bB}	83,93±0,21 ^{cD}	81,77±11,66 ^{dE}
Verde	57,67±1,81 ^{bD}	43,88±1,30 ^{aB}	52,64±6,75 ^{bB}	57,07±4,63 ^{cB}
Verde padrão	6,23±1,36 ^{cA}	20,98±3,22 ^{bA}	52,52±3,76 ^{aA}	46,64±3,24 ^{aA}
Verde italiano	10,19±1,26 ^{aB}	72,90±3,98 ^{bC}	71,34±1,10 ^{bC}	78,90±1,36 ^{cD}
Piripiri	82,49±0,55 ^{bC}	75,06±2,34 ^{aC}	86,09±0,42 ^{cD}	84,65±1,10 ^{cD}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

Observando os resultados, verificamos que tal com o aconteceu com o método do DPPH também aqui os valores da capacidade antioxidante dos diferentes extratos

variaram em função do tipo de solvente utilizado na extração, mas neste método as maiores percentagens de atividade antioxidante foram obtidos, de um modo geral, para os extratos preparados com metanol 100 e 80 % (entre 68 e 70 % respetivamente). Já os extratos preparados com o solvente hexano apresentaram menores percentagens de atividade antioxidante (em média 30%). De um modo geral também neste método a atividade antioxidante variou em função do tipo de variedade de pimento, variando entre 5,55 e 84,65%, mas o piri-piri foi aquele que apresentou maior atividade, com valores médios a variarem entre os 75 e 86 % de inibição de radicais de ABTS, seguido do pimento vermelho com variações entre os 39 e 79 % de inibição de radicais de ABTS (Tabela 15).

5.2.3. Inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os resultados obtidos com a aplicação deste método, encontram-se descritos seguidamente na Tabela 16, expressos em percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno/ácido linoleico.

Tabela 16. Resultados relativos á atividade antioxidante (% inibição) dos diferentes pimentos em estudo em função, do solvente de extração através da inibição da oxidação lipídica.

Pimento	% Inibição*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	3,10±0,00 ^{ab}	9,34±0,51 ^{cc}	3,20±0,00 ^{aa}	6,67±0,06 ^{bc}
Vermelho italiano	9,27±0,93 ^{cd}	4,40±0,50 ^{ab}	5,23±0,65 ^{bb}	5,43±0,68 ^{bc}
Amarelo	9,59±0,09 ^{cd}	1,65±0,05 ^{aa}	5,3±1,25 ^{bb}	4,67±0,67 ^{bb}
Verde	1,13±1,05 ^{ab}	3,27±0,21 ^{aa}	3,83±0,35 ^{ba}	3,03±0,31 ^{aa}
Verde italiano	3,27±0,06 ^{cb}	7,30±2,14 ^{bc}	4,53±0,93 ^{ab}	13,67±0,15 ^{ad}
Verde padrão	1,13±1,05 ^{ba}	1,93±0,72 ^{ba}	6,83±0,84 ^{cc}	1,43±0,06 ^{aa}
Piripiri	7,00±0,44 ^{ac}	9,4±0,45 ^{cc}	6,50±2,96 ^{cd}	4,03±1,31 ^{ab}

*Valores expressos em média \pm desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

Numa análise aos resultados, verificamos que os diferentes extratos apresentaram uma baixa atividade antioxidante, variando entre 1,13 e 13,67%. Contudo, constatou-se que a atividade antioxidante do pimento verde italiano, foi ligeiramente superior às restantes, com 13,67%. Por outro lado, o pimento verde padrão apresentou baixa atividade antioxidante, com apenas 1,13%. A percentagem de inibição pela oxidação lipídica não foi dependente do solvente de extração, pois a atividade percentual de inibição foi igualmente baixa para todos os solventes extratores.

No entanto, a fraca capacidade antioxidante pela inibição da oxidação lipídica pode estar relacionada com a presença de outros compostos bioativos, existentes nos frutos mas que não foram determinados nos extratos testados, na qual não deverão ser ignorados, como por exemplo compostos voláteis, como o limoneno e a β -ionona (Shan et al., 2005), ácidos orgânicos, como o oxálico, cítrico, málico e sucínico, (Materska & Perucka, 2005; Seabra et al., 2006).

5.2.4. Aprisionamento de radicais hidroxilo

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados referentes à capacidade sequestrante dos extratos obtidos a partir dos pimentos de diferentes variedades sob estudo para o radical hidroxilo e cuja ilustração da aplicação do método se apresenta na Figura 21.

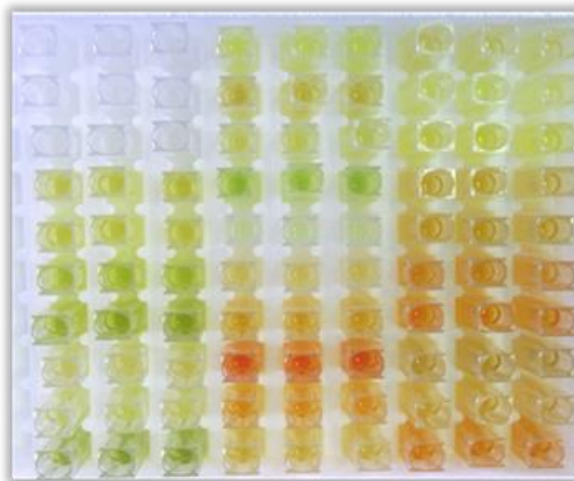


Figura 21. Extratos preparados para posterior leitura espectrofotométrica para determinação da atividade antioxidante pelo aprisionamento de radicais hidroxilo

Tabela 17. Resultados relativos á atividade antioxidante (%AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração através do aprisionamento dos radicais.

Pimento	%AA*			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	34,80±0,83 ^{aA}	85,85±0,00 ^{cE}	55,88±0,55 ^{bB}	55,15±2,30 ^{bB}
Vermelho italiano	90,50±2,30 ^{bD}	88,69±0,28 ^{bE}	46,14±1,68 ^{aA}	44,18±2,43 ^{aA}
Amarelo	46,14±0,00 ^{aB}	45,77±0,00 ^{aC}	92,34±1,05 ^{cD}	61,52±0,11 ^{bC}
Verde	52,21±0,37 ^{bB}	54,96±4,22 ^{bD}	42,89±1,47 ^{aC}	89,89±0,92 ^{cD}
Verde italiano	75,61±5,15 ^{bC}	48,47±5,38 ^{aD}	97,24±0,00 ^{cD}	89,58±0,46 ^{cD}
Verde padrão	77,57±0,18 ^{bC}	31,25±0,00 ^{aB}	88,05±0,00 ^{cC}	43,08±0,83 ^{bA}
Piripiri	37,13±4,28 ^{bB}	22,18±3,96 ^{aA}	39,83±4,97 ^{bA}	51,84±3,62 ^{cB}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 17, verificou-se que o metanol 100% foi o solvente mais adequado ao aprisionamento do radical hidroxilo, por outro lado, o hexano revelou-se o menos apropriado, embora os resultados não apresentem diferenças significativas.

Contudo, o pimento verde italiano apresentou maior atividade antioxidante relativamente a este método, com 97,24%. Também o pimento amarelo apresentou resultados percentuais similares ao pimento verde italiano, com 92,34%. Em contrapartida o piri-piri foi o extrato com menor poder antioxidante, seguido do pimento verde padrão, com 22,18 e 31,25% respetivamente.

5.2.5. Quelatização de metais

Os resultados relativos à atividade antioxidante pelo método de quelatização de metais dos extratos de pimentos, encontram-se expressos na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados relativos á atividade antioxidante (% AA) dos diferentes pimentos em estudo em função do solvente de extração pelo método de quelatização de metais.

Pimento	% AA *			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	1,50±0,49 ^{aB}	1,76±1,01 ^{aB}	42,28±1,02 ^{bF}	51,02±5,30 ^{cF}
Vermelho italiano	0,92±0,00 ^{bB}	0,26±0,00 ^{aA}	14,02±1,29 ^{cD}	1,47±1,02 ^{bB}
Amarelo	0,00±0,00 ^{aA}	0,07±0,00 ^{bA}	0,00±0,00 ^{aA}	9,70±4,09 ^{cD}
Verde	0,00±0,00 ^{aA}	2,29±0,00 ^{bB}	7,93±0,00 ^{cC}	7,57±0,00 ^{cC}
Verde italiano	0,00±0,00 ^{aA}	8,29±0,00 ^{bC}	17,17±4,38 ^{cE}	0,00±0,00 ^{aA}
Verde padrão	0,00±0,00 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aA}	0,74±0,20 ^{aA}	21,46±1,70 ^{bE}
Piripiri	0,00±0,00 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aA}	1,21±0,23 ^{bB}	10,55±3,35 ^{cD}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

Assim como a inibição da oxidação lipídica pelo Sistema β -caroteno/ácido linoleico, o método de quelatização de metais também apresentou resultados baixos comparativos a outros métodos de determinação de atividade antioxidante. Os solventes metanol 100 e 80% foram aqueles em que se registaram as maiores atividades antioxidantes (Tabela 18), o que poderá ser indicativo que estes serão os mais adequados para extração de compostos quando for este o método de quantificação da atividade antioxidante. Apesar destes fracos resultados, verificamos que foi o pimento vermelho que apresentou maiores teores médios de atividade antioxidante, confirmando os resultados obtidos em métodos anteriores.

5.2.6. Efeito do poder redutor

Neste tipo de método de determinação da atividade antioxidante o aumento de absorvância indica um maior poder redutor, ou seja uma maior atividade antioxidante. De acordo com a metodologia descrita na secção 4.8.4. o ião Fe^{3+} é reduzido na presença do antioxidante para a forma Fe^{2+} . Dessa forma, a formação de azul “Perl’s Prussian”, medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe^{2+} .

Nas Figuras 22 e 23 mostram-se os diferentes extratos, sujeitos ao método do poder redutor com as respetivas alterações de cor. O grau de intensidade da cor é variável em função do poder antioxidante de cada extrato (Figura23).

Os resultados obtidos relativos ao efeito do poder redutor encontram-se descritos na Tabela 19, expressos em mg de equivalentes de ácido ascórbico.g⁻¹ de peso seco.



Figura 22. Extratos obtidos antes da adição do cloreto de ferro (III)



Figura 23. Extratos obtidos após a adição de cloreto de ferro (III)

Tabela 19. - Resultados relativos à atividade antioxidante (mg de ácido ascórbico equivalente/g peso seco) dos diferentes pimentos em estudo em função, do solvente de extração através do poder redutor

Pimento	Poder redutor (mg de ácido ascórbico equivalentes.g ⁻¹ peso seco)			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol 100%	Metanol 80%
Vermelho	8,84±0,13 ^{aB}	25,40±1,03 ^{bD}	26,94±1,14 ^{bB}	36,25±0,88 ^{cD}
Vermelho italiano	13,55±0,33 ^{aC}	12,10±0,90 ^{aC}	25,11±3,01 ^{cB}	24,25±0,20 ^{bB}
Amarelo	6,76±0,13 ^{aA}	9,64±0,50 ^{bB}	28,05±1,28 ^{cB}	26,35±4,07 ^{cC}
Verde	5,22±0,10 ^{aA}	9,45±0,19 ^{bB}	35,37±1,68 ^{cD}	19,89±13,40 ^{cD}
Verde italiano	4,45±0,06 ^{aA}	12,65±0,22 ^{bC}	32,62±1,79 ^{dD}	23,51±1,48 ^{cB}
Verde padrão	8,96±0,18 ^{aB}	12,87±0,32 ^{aC}	30,32±0,46 ^{bC}	28,29±0,64 ^{bC}
Piripiri	5,94±0,15 ^{aA}	6,54±0,20 ^{aA}	10,27±1,03 ^{cA}	7,54±0,27 ^{bA}

*Valores expressos em média ± desvio-padrão de três ensaios. Na mesma linha, letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solventes. Na mesma coluna, letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas diferentes ($p < 0,05$) entre extratos.

Numa análise aos resultados obtidos para os diferentes extratos e diferentes tipos de pimento, apresentados na Tabela 19, constatou-se que as maiores percentagens de atividade antioxidante se encontraram para os solventes metanol 100 e 80%, o que significa que para este tipo de método de determinação de atividade antioxidante o metanol será o solvente mais adequado. Dos extratos sujeitos ao método, o pimento verde apresentou maior poder redutor com 35,37 mg.g⁻¹ de peso seco. Resultados similares foram encontrados para as amostras de pimento verde italiano e pimento verde padrão, com 32,62 e 30,32 mg.g⁻¹ respetivamente. Também o pimento vermelho apresentou elevado poder redutor, no contexto global dos resultados relativos a este método. Contudo, contrariamente ao metanol 100% o hexano e o acetato de etilo revelaram-se os solventes menos adequados ao método do poder redutor.

5.3. Atividade antioxidante *versus* compostos bioativos

A forte capacidade antioxidante dos extratos do pimento contra o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), a captura do radical livre *ABTS*⁺, poder redutor, descoloração da emulsão β -Caroteno/ácido linoleico, quelatização de metais, e através do método de aprisionamento de radicais

hidroxilo pode ser justificada pelo seu maior ou menor conteúdo de compostos bioativos. Diferentes autores têm revelado que os efeitos antioxidantes apresentados pelos frutos e vegetais estão relacionados com três grandes grupos de compostos: ácido ascórbico, fenólicos (como antioxidantes hidrofílicos) e carotenoides (como antioxidantes lipofílicos) (Halliwell *et al.*, 1996). No entanto, a presença de outros compostos e seus respectivos derivados, presentes na composição química do pimento que não foram determinados nos extratos testados, não deverá ser ignorada.

Para avaliar esta possível relação entre os teores médios em compostos bioativos detetados nas diferentes variedades de pimento e a respetiva atividade antioxidante foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), cujos resultados se apresentam nas Figuras 24 e 25. A Figura 24 mostra a projeção das variáveis agrupadas, no plano composto pelos eixos principais componente 1 e componente 2.

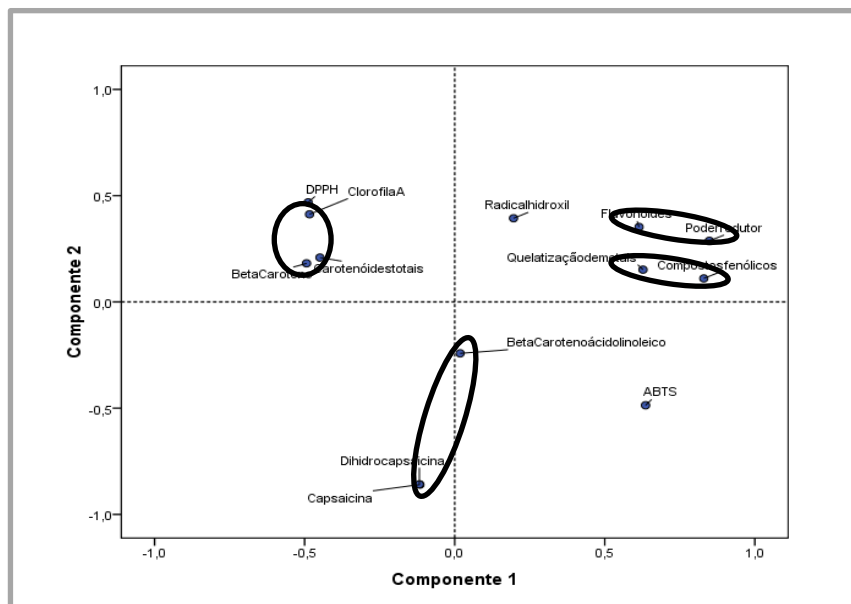


Figura 24. Diagrama de componentes principais (PCA) da atividade antioxidante e compostos bioativos analisados nos diferentes extratos.

Diversos estudos têm referenciado o pimento como uma excelente fonte de compostos bioativos com capacidade antioxidante (Kähkönen *et al.*, 1999; Conforti *et al.*, 2007; Deepa *et al.*, 2007). Numa análise ao diagrama dos componentes principais, a forte atividade antioxidante do pimento pelo método do DPPH projetada pelos eixos da componente 1 negativo e componente 2 positivo, pode ser justificada pelo teor de carotenoides (Clorofila a, carotenoides totais e β -caroteno) já reconhecidos como

antioxidantes (Bae *et al.*, 2012). A ação antioxidante do extrato acetato de etilo e hexano para o método de DPPH justifica-se pela presença significativa de clorofilas a e b encontrados nesta fração, embora o extrato metanol 100% no pimento verde padrão ter apresentado elevada concentração de clorofilas, a sua ação antioxidante possivelmente foi afetada por outros compostos que interagiram de forma negativa neste sistema. Segundo Young & Lowe (2001) e Tapiero *et al.* (2004), os carotenoides apresentam propriedades antioxidante devido principalmente ao sistema de duplas ligações conjugadas, fazendo com que sejam capazes de capturar os radicais livres.

Ranilla *et al.* (2010) avaliaram os parâmetros químicos e a atividade antioxidante dos frutos de *C. annuum*, e constataram que apresentavam baixo teor em fenóis totais. No entanto, apresentaram alta atividade contra o radical DPPH, sugerindo que a capacidade antioxidante do pimento não se deve apenas aos compostos fenólicos, mas também à presença de outros metabolitos.

Bae *et al.* (2012) avaliaram a atividade antioxidante em diferentes variedades de pimentos pela inibição do DPPH e constataram que o pimento apresenta média a elevada atividade antioxidante, com uma variação entre 22,5% a 95,1%. Contudo, indicaram que a quantidade de componentes extraíveis a partir de pimentos estava associada com o poder redutor. Além disso, os extratos não polares apresentaram maior poder redutor do que os extratos polares.

Os resultados obtidos para o efeito do poder redutor podem ser justificados pelo conteúdo de flavonoides totais. Os resultados mostraram que a quercetina e o ácido gálico destacaram-se pela maior concentração nos pimentos em estudo, com $26,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco para o pimento verde padrão e $60,65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco para o pimento vermelho. O pimento vermelho italiano também apresentou concentrações semelhantes ao pimento vermelho. Os resultados da atividade antioxidante através do método do poder redutor, podem estar associados a estes flavonoides. Isso ocorre devido à quercetina ser um flavonol com cinco hidroxilos reativos, sendo que dois deles estão ligadas ao anel que possui maior atividade redutora, apresentando estabilidade por ressonância. Por outro lado, a atividade antioxidante pelo método ABTS também pode estar correlacionada com estes compostos.

Bae *et al.* (2012) comprovaram que os carotenoides e fenóis totais têm correlações positivas com o método do poder redutor e a degradação da desoxirribose. Contudo, Jeong *et al.* (2011) demonstraram que a atividade antioxidante usando DPPH,

ABTS e poder redutor têm resultados muito similares. No presente estudo o método do poder redutor apresentou menor atividade antioxidante comparativamente aos métodos DPPH e ABTS. Isso porque os resultados dependem segundo Dorman *et al.* (2003), da natureza e estrutura química dos compostos fenólicos presentes no extrato. Também os compostos que possuem ação antioxidante podem variar em função da espécie do pimento, das condições de cultivo da mesma e da forma de extração, afetando diretamente a atividade inibitória do extrato (Deans *et al.*, 1987). Contudo, o estágio de maturação do pimento pode também influenciar a atividade antioxidante dos compostos bioativos. Conforti *et al.* (2007) constataram que os frutos mais imaturos apresentaram melhor atividade antioxidante, devido a uma composição mais rica em compostos fenólicos e fitosteróis.

Numa análise ao diagrama dos componentes principais (Figura 24), a reduzida atividade antioxidante do pimento pelo método de quelatização de metais projetada pelos eixos da componente 1 e componente 2 positivos, pode estar associada ao reduzido teor de fenólicos totais quantificados. O fraco desempenho dos extratos acetato de etilo e hexano nas amostras de pimento provavelmente ocorreu pela presença de outros compostos fenólicos, não identificados no presente trabalho, bem como outros compostos antioxidantes que interagiram entre si, proporcionando melhor ação antioxidante, pois extratos altamente polares como metanol segundo Simões *et al.* (2000), extraem heterosídeos em geral, praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica, apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%. Contudo, a reduzida atividade percentual de inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-ácido linoleico, pode ser justificada pelo teor de capsaicinóides, dado que os extratos em estudo apresentaram concentrações reduzidas destes alcalóides, dificultando a sua identificação, há exceção do piripiri, onde foram detetadas elevadas concentrações de capsaicina, $17.571,24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Na análise aos resultados verificou-se que a atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico apresentou maior atividade antioxidante para o piripiri comercial. No entanto o pimento verde italiano também apresentou atividade antioxidante muito semelhante ao piripiri.

Howard *et al.* (2000), obteve para o extrato metanólico do pimento da espécie *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

crecentes de carotenóides nos frutos maduros: 414 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco de β -criptoxantina; 1252 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco de α -caroteno; 1187 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco de β -caroteno; 1443 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco de capsantina e 1958 $\mu\text{g. g}^{-1}$ de peso seco de zeaxantina.

A Figura 25 correlaciona os pimentos em estudo entre si, de acordo com o seu potencial antioxidante e composição química.

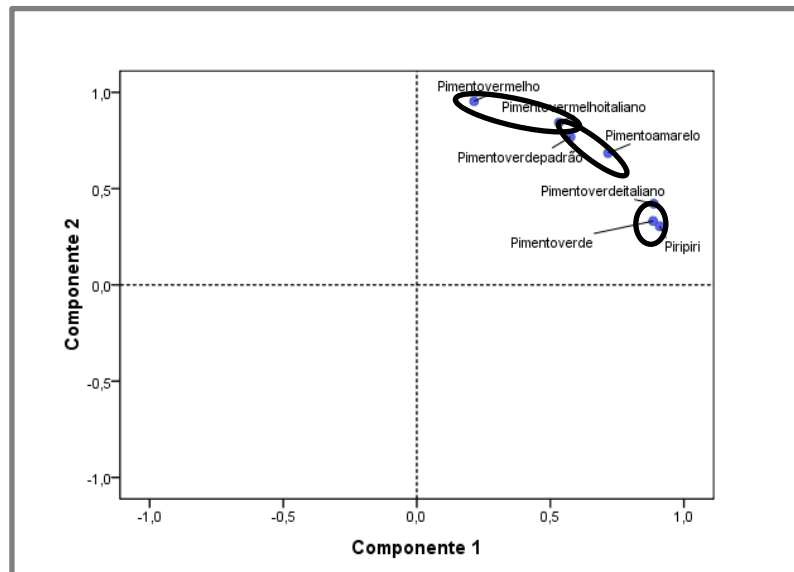


Figura 25. Diagrama de componentes principais da actividade antioxidante e compostos bioactivos analisados nos diferentes extractos de acordo com os respectivos solventes de extracção.

Através dos componentes em estudo, o pimento verde italiano, o pimento verde e o piri-piri estão relacionados entre si, devido em parte pelo conteúdo fenólico total e como o β -caroteno que comparativamente aos restantes pimentos foi mais elevado. Contudo, também o pimento verde italiano e o piri-piri também se correlacionam pela elevada concentração de quercetina. No entanto outros compostos os assemelham. Por outro lado, o pimento amarelo, pimento verde-padrão e pimento vermelho-italiano apresentam características químicas que lhes confere proximidade, talvez por apresentarem teores em clorofilas a, clorofila b e teores médios em fenóis totais muito próximos. Já o pimento vermelho e pimento vermelho italiano apresentaram teores médios em quercetina, β - caroteno e ácido gálico muito semelhantes.

CAPITULO VI- CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos com a realização deste estudo, podemos concluir que os objetivos a que nos propusemos foram atingidos na medida em que conseguimos caracterizar convenientemente a composição nutricional e teor médio em compostos bioativos das diferentes cultivares de pimento mais representativas em Portugal. Conseguimos claramente diferenciar as variedades de pimento em estudo sendo o pimento verde padrão aquele que apresentou maior teor em β -caroteno, vitamina C e fenóis totais e individuais e clorofilas. O pimento verde, pimento vermelho, pimento vermelho italiano e piri-piri apresentaram teores intermédios em compostos fenólicos, vitamina C, clorofilas. O piri-piri que serviu para comparação com as diferentes variedades de pimento apenas apresentou maior teor de capsaïcina que aliás foram exclusivos desta cultivar. Relativamente á riqueza em compostos fenólicos individuais apenas foram determinados três compostos, nomeadamente ácido gálico, luteolina e quercetina cujos maiores teores foram encontrados para o pimento verde, pimento verde padrão. Relativamente ao teor médio em vitamina C, e contrariamente ao que estávamos à espera, as diferentes variedades de pimento em estudo apresentaram teores médios inferiores aos encontrados por outros autores para outras variedades de pimento. Estes resultados poderão ser explicados não só pelo fator cultivar, fatores edáfo-climáticos e época de produção.

Relativamente à atividade antioxidante verificamos que a escolha do método bem como do solvente utilizado na extração pode influenciar os valores médios alcançados. Assim, tivemos variações entre os 58,12 e 87,52% para o método de DPPH, entre 5,52 e 83,93% para o método de ABTS, entre 1,13 e 9,34% para o método de β -caroteno, entre 22,18 e 92,4% para o método dos radicais hidroxilo e entre 0 e 51,02% para o método da quelatização de metais. Já no poder redutor verificamos variações de atividade antioxidante entre os 6,5 e os 36,3 mg de equivalentes de ácido ascórbico.g⁻¹ de peso seco. Assim, em função destes resultados parece-nos que o método de DPPH e radicais hidroxilo são os mais adequados para a determinação da atividade antioxidante neste tipo de material vegetal, talvez por estes métodos serem os mais adequados quando estão em causa compostos como ácidos fenólicos e flavonóides

(ácido gálico, quercetina, luteolina), clorofilas a e b e carotenoides, compostos identificados neste tipo de material vegetal.

Perante estes resultados podemos assim afirmar que as variedades de pimento produzidas em Portugal apresentam teores moderados a elevados de compostos bioativos, com uma moderada a elevada atividade antioxidante, pelo que este tipo de material deve ser não só incorporado na dieta alimentar como o seu consumo deve ser incrementado numa perspetiva de uma dieta saudável.

Finalmente, este estudo permitiu demonstrar que as diferentes variedades de pimento produzidas em Portugal apresentam um potencial biológico elevado pela capacidade em ser uma fonte de natural de compostos antioxidantes relativamente a outros frutos e vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D. (2006). *Manual de Culturas Hortícolas* (Vol. II). Lisboa: Editorial Presença, pp 211-219.
- Adnan Jassim Mohammed. Sameerah Ahmed Zearah. (2013) Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxicity Activities of Flavonoid Extract From *Capsicum annuum* L. Seeds *Iraqi National Journal of Chemistry*, volume 49, 100.
- Arts, I.C.W. & Hollman, P.C.H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317–325.
- Arabbi, PR., Genovese, M.I. & Lajolo, F. (2004). Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1124-1131.
- Bae, H., Jifon, J. & Patil, B.S. (2012). Variation of antioxidante activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food chemistry*, 134, 192-1918.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bosland, P.W. & Votava, E.J. (2000). *Peppers: vegetables and spice capsicum*. Oxon: CABI Publishing, 204 pp.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Bento, C.S., Sudre, C.P., Rodrigues, R., Riva, E.M. & Pereira, M.G. (2007). Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Sciencia Agraria*, 8, 149-156.
- Carvalho, S.I.C., Biachetti, L.D.B., Bustamante, P.G. & Silva, D.B. (2003). Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.). Embrapa Hortaliças (Eds), DF: Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil, 49 pp.
- Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R.R. & Cotter, J.L. (2010). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 340-345.

- Chun, O. K., Smith, N., Sakagawa, A. and Lee, C. Y. 2004. Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *International Journal of Food Science and Nutrition* 55 (3): 191-199.
- Conforti, F., Statti, G.A. & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*, 102, 1096-1104.
- Costa, M.A.L., Ortega-Flores, C.I. & Penteado, M.V.D.C. (2002). Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do β -caroteno. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22, 224-228.
- Costache, M.A., Campeanu, G. & Neata, G. (2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 5, 7703-7708.
- Chen, L. & Kang, Y.H. (2013) Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *Journal of Functional Foods*, 702-701.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B. & Kapoor, H.C. (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 121-129.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G.C., Da Cunha, M., Alves, E.W., Okorokova-Façanha, A.I., Oliveira, M.A., Parales, J., machado, O.L.T. e Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chilipeppers seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the médium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1760:1323-1332.
- Diaz J., Pomar F., Bernal A., Merino F., 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3, 141–157.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K & Liu, H.R (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 50, 3010-3014.
- Diplock, A.T., Agget, P.J., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E.B & Roberfroid, M.B. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81 Suppl 1, S1- S27

- Delgado-Vargas, F. & Paredes-Lopez, O. (2003). Chemicals and colorants as nutraceuticals. In: Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses (Delgado-Vargas, F.; Paredes-Lopez, O., Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 257–298.
- Duthie, S. J., Jenkinson, A. McE., Crozier, A., Mullen, W., Pirie, L., Kyle, J., et al. (2006). The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45(2), 113–122.
- Dorman, H.J.D. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *mamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, 83, 255-262.
- Dewick P.M., (2009). Medicinal natural products: a biosynthesis approach, 3rd edition. Wiley (New jersey), 405.
- Esbaugh, WH. (1993). W. H. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: New crops, Janick, J. and Simon, J.E. (Eds.), New York, USA, p. 132-139.
- FAOSTAT, (2011). <http://faostat.fao.org>
- Fu, Y. J., Liu, W., Zu, Y.G., Tong, M.H., Li, S.M., Yan, M.M., Efferth, T. & Luo, H. (2008). Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea leaves. *Food Chemistry*, 111, 508-512.
- .Gomes, N.G.M., Campos, M.G., Órfão, J.M.C., Ribeiro, C.A.F. (2009). Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33, 1372-1389.
- Govindajaran, V.S., D. Rajalakshmi, and N. Chand.(1987). Capsicum production, technology, chemistry and quality. Part IV. Evaluation of quality. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25:185–283
- Gulçin, I., Sat, I. G., Beydemir, S et al (2004). Evaluation of the vitro antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.) *Ital. J. Food Sci.* 16:17-30
- Gulçin, I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4- dhydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213-220.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Krombout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Howard, L.R., Talcott, S.T., Brenes, C.H. & Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1713-1720.
- Howard, L.R., Smith, R.T., Wagner, A.B., Villalon, B. & Burns, E.E. (1994). Provitmain A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *Journal of Food Science*, 59, 362-365
- Hassimoto, N.M.A., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- Hayman M., Kam P.C.A., (2008) Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia and Clinical care* 19, 338-343
- Haeghele, A.D., Gillete, C., O'Neil, C., Wolf, P., Heimendiger, J. & Sedlacek, S. (2000). Plasma xanthophylls carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer epidemiology Biomarkers*, 9, 421-425.
- Hernández-Ortega, Alicia Ortiz-Moreno, Maria Dolores Hernández-Navarro, German Chamorro-Cevallos, Lidia Dorantes-Alvarezallos and Hugo Necochea-Mondragon. (2012) Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L) *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 524019, 10 pages
- Iorizzi, M., Lanzotti, V., Ranalli, G., Marino, S., Zollo, F. (2002). Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4310-4316.
- Jeong, W. Y., Jin, J. S., Cho, Y. A., Lee, J. H., Park, S., Jeong, S. W., et al (2011) Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *Journal of separation Science*, 34, 2967-2974

- Jin,R.:N,R.;Fan,L.;L.;AN,X.(2011)Microwave assisted ionic liquid pretreatment of medicinal plants for fast solvent extraction of active ingredients. Separation and Purification Technology, 83, 45–49.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke E and Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant activity and total phenolics content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemistry 83: 547-550
- Klein, B. P. and Perry, A.K .(1982) Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. J.Food Sci. 47:941-945.
- Kähkönen, M., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kamalakkannan, N. & Prince, S.M.P. (2006). Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 293, 211-219.
- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. Arch Intern Med; 156(6):637-642.
- Kaur, C. & Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science & Technology, 37, 153- 161.
- Knekt, P.; Jarvinen, R.; Reunanen, A.; Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. Br. Med. J., 312, 478-481.
- Kang Mo Ku and Young Hwa Kang (2010) Quinone Reductase Inductive Activity of *Capsicum annuum* Leaves and Isolation of the Active Compounds. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53(6), 709-715
- Kozukue, N., Han, J., Kozukue, E., Lee, S., Kim, J., Lee, K., Levin, C. & Friedman, M. (2005). Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high performance liquid chromatography and liquid chromatography – Mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9172-9181.
- Kirschbaum-Titze, P.; Hiepler, C.;Muller- Seitz, E.; Petz, M. (2002) Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p.1260-1263.

- Loke, W.M., Proudfoot, J.M, Stewart, S., Mckinley, A.J., Needs, P.W., Kroom. P., et al (2008) . Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetina:Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical pharmacology*, 75, 1045-1053.
- Lee, S.K. & Kader, A.A. (2000). Pre-harvest and post-harvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Lichtenhaler, H.K. & Wellburn, A.R. (1985). Determination of total carotenoids and chorophylls a and b of leaf in different Solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592.
- Liu, RH. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479S-85S.
- Liu, A., Wang, H.,Lee, S.M.,Wang, Y., & Du, G. (2008). Structure- activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 7141-7147.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.
- López- Berenguer C, Carvajal M, Moreno DA, Garcia- Viguera C.(2007) Effects of microwave cooking conditions on biactive compounds presente in bnroccoli inflorescences. *J. Agric. Food Chem*; 55 (24): 10001- 10007
- Lu, J., Papp, L.V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B. & Holmgren, A. (2006). Inhibition of mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: Implications for myricetin and quercetin anticancer activity. *Cancer Research*, 66, 4410-4418.
- Madhumathy, A.P., Aivazi A.A. & Vijayan, V.A. (2007). Larvicidal efficacy of *Capsicum annum* against *Anopheles stephnsi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44, 223-226.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-47.
- Marino, S., Borbone, N., Gala, F., Zollo, F., Fico, G., Pagiotii, R. & Iorizzi, M. (2006). New constituents of sweet *Capsicum annum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7508-7516.

- Matusheski, N.V., Swarup, R., Juvik, J.A, Mithen, R., Bennett, M. & Jeffery, E.H. (2006) Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. spp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent suloraphane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2069- 2076.
- Materska, M. & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1750-1756.
- Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M. & Takeda, M. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3468-3472.
- Mazourek, M., Pujar, A., Borovsky, Y., Paran, I., Mueller, L. & Jahn, M.M. (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150, 1806-1821.
- Meghvansi, M.K., Siddiqui, S., Khan, M.H., Gupta, V.K., Vairale, M.G., Gogoi, H.K. & Singh, L. (2010). Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 1-14.
- Maléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2004). Importância nutricional de los pigmentos carotenóides. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54, 149-155.
- Maldonado-Robledo, G., Rodriguez-Bustamante, E., Sanchez-Contreras, A., Sonoja, R., Sanchez-Contreras, A., Rodriguez-Sonoja, R. & Sanchez, S. (2003). Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 62, 62:484–488.
- Mou, B. (2005). Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 870-876. . 130, 870–876.
- Matsuura-Endo C, Ohara-Takada A, Chuda Y, Ono H, Yada H, Yoshida M, Kobahashi A, Tsuda S, Takigawa S, Noda T, Yamauchi H, Mori M (2006). Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70(5): 1173-1180.

- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J. & Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Nicolle, C. et al. (2004) Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 523-529.
- Nazzaro, F., Caliendo, G., Arnesi, G., Veronesi, A., Sarzi, P. & Fratianni, F. (2009). Comparative content of some bioactive compounds in two varieties of *Capsicum annuum* L. sweet pepper and evaluation of their antimicrobial and mutagenic activities. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 853-868.
- Osuna-García, J.A., Wall, M.M. & Waddell, C.A. (1998). Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of New Mexican-type chili (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5093-5096.
- Othman, Z.A.A., Ahmed, Y.B.H., Habila, M.A. & Ghafar, A.A. (2011). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*, 16, 8919-8929.
- Olumuyiwa Emmanuel Olukayode, Babalola G.O. & Ademola O. Olaniran. (2013) The Effect of pyridinium chlorochromete (P.C.C) on the bacterial load of chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds and seedlings. *International Journal of advanced Biological Research.*, I.J.A.B.R, VOL. 3(2) 2013: 236-241
- Oh, M. M., Carey, E. E., & Rajashekar, C. B. (2009). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (7), 578-583.
- Perucka, I. & Oleszek, W. (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 71, 287-291.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96, 129-133.
- Pichersky, E. & Gang, D.R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5, 439-445.

- Rahman, F.M.M., Buckle, K.A. & Edwards, R.A. (1978). Changes in total solids, ascorbic acid and total pigment content of capsicum cultivars during maturation and ripening. *Journal of Food Technology*, 13, 445-450.
- Ranilla, L.G., Kwon, Y., Apostolidis, E. & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101, 4676-4689.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Ross, J.A. & Kasum. C.M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. Nutr* 22:19-34.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M. & Dessi, M. A. (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7396-7401.
- Rubio, C., Hardisson, A., Martín, R., Báez, A., Martín, M. & Álvarez, R. (2002). Mineral composition of the red and green pepper (*Capsicum annuum*). *Island European Food Technology*, 214, 501- 504.
- Reifschneider, F.J.B. (2000). *Capsicum*. Pimentas e Pimentões do Brasil. Brasília, DF: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/ Embrapa Hortaliças, 113 pp.
- Rodriguez-Amaya, D. B.; Amaya-Farfan, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar pró-vitamina A. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 44, n. 1, p. 180-199, 1992
- Sanatombi, K. & Sharma, G.J. (2008). Capsaicin content and pungency of different *Capsicum* spp. cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36, 89-90.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. & Saura-Calixto, F.A. (1998). Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276, 1998.

- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (2000). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Universidades/UFRGS (2nd Ed.) UFSC, Brasilia, Brasil.
- Seelinger G, Merfort I, Wölfl U, Schempp CM (2008). Anticarcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, 13: 2628-2651.
- Sousa, C., Valentão, P., Rangel, J., Lopes, G., Pereira J.A, Ferreres, F., Seabra, R.M. & Andrade, P.B. (2005). Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9128-9132.
- Stefanelli, D., Goodwin, I. & Jones, R. (2010). Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrient. *Food Research International*, 43, 1833-1843.
- Stratil, P., Klejdus, B. & Kubán, V. (2006). Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Theirs Antioxidant Activity in Vegetables- Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607-616.
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C.T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W. & No, H.K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, 72, 98-102.
- Salleh, W.M.N.H.W., Ahmad, F., Yen, K.H., and Sirat, H.M (2012). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). *Natural Product Communications* 7(12): 1659-1662.
- Shetty, K. (2004). Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Process. Biochemistry*, 39,789-803.
- Sikora E, Cieslike, Leszczynska T, Filipiak- Florkiewicz A, Pisulewski PM. (2008) The antioxidant activity of select cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem* ;107(1): 55-59
- Tiwari. U, E. Cummins (2013) Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre-and post-harvest food processing operations. *Food research international* 50. 497- 506.
- Tiwari, U., & Cummins, E. (2009). Factors influencing β -glucan levels and molecular weight in cereal-based products. *Cereal Chemistry*, 86 (3), 290-301.

- Topuz, A. & Ozdemir, F. (2007) Assessment of carotenoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 596-602.
- Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K.K.D. (2004) . The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacotherapy*, v.58, p.100-110.
- Vision, J.A., Hao, Y., Su, Y.H. & Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3630-3634.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P. & Seabra, R.M. (2005). Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3626-3630.
- Vaughan, J.G. & Geissler, C.A. (1997). The new Oxford book of food plants. New York:Oxford University Press; p. 146, 212, 214.
- Weiss, E.A. (2002). *Spice Crops*; CABI Publishing International: New York, NY, USA, 411 pp.
- Wahba NM, Ahmed AS, Ebraheim ZZ. (2010). Foodborne Pathog. Dis. 7:411-418
- WHO. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization 2009, All rights reserved, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland, ISBN 978 92 4 156387 1, 70 pp.
- Yamamoto, S., & Nawata, E. (2005). *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. *Economic Botany*, 59, 18-28.
- Youwein, Z., Jinlian, Z., and Yonghong, P.(2008). A comparative study on the free radical scavenging of some fresh flowers in southern China. *I.Wt- Food Science and Techonology* 41 (9): 1586-1591.
- Young, A. & Lowe, OWE, G.M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant proprieties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 20-27. 2001.
- Zhang, D.,& Hamauzu, Y.(2003). Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow nell peppers. *Food, Agriculture & Environment*, 2, 22E27.