

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**VIRGINIA DEMARCHI KAPPEL**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E**  
**ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Capsicum baccatum* L. var.**  
***pendulum***

**Porto Alegre - RS**

**2007**

**VIRGINIA DEMARCHI KAPPEL**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Capsicum baccatum* L. var.  
*pendulum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

**Porto Alegre - RS**

**2007**

**DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais*

*pelo amor e apoio constante.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, pela orientação, oportunidade e amizade, acreditando no meu potencial;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, pelo auxílio e sugestões, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda;

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Valente, pela acolhida em seu laboratório;

Aos professores do departamento de Bioquímica que contribuíram para minha formação;

Aos colegas e amigos Francilene, Gustavo, Maria e Simone, pela convivência e amizade criada, que tornaram este período muito mais agradável;

Aos colegas Geison e Melissa, pela ajuda e amizade;

Aos colegas do laboratório 32, pelas discussões e trocas de experiências que contribuíram para este trabalho;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica;

Aos meus pais e ao meu irmão por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem e apoiarem sempre, o que tornou possível a realização deste meu objetivo.

Ao Daniel, pelo apoio, pela tolerância e pelo seu amor;

Aos amigos e familiares, pela torcida e pelo apoio nas horas de desânimo;

A Deus, pela força inexplicável.

*"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos".*

*Martin Luther King*

## RESUMO

Muitos estudos epidemiológicos têm indicado uma associação inversa entre o consumo de frutas e vegetais com altos níveis de compostos fenólicos e o risco de doenças crônicas relacionadas com estresse oxidativo. Pimentas ou pimentões (*Capsicum sp*) são popularmente usadas como temperos ou vegetais, e são uma fonte significativa de compostos antioxidantes, mas os níveis destes fitoquímicos podem variar devido ao genótipo e maturação. *Capsicum baccatum* (pimenta cambuci) é amplamente utilizada no sul do Brasil e que possui poucos estudos na literatura sobre sua composição química e suas propriedades biológicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de diferentes partes dos frutos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L.. Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos de três diferentes partes (pericarpo, placenta, sementes) dos frutos frescos de *C. baccatum*, que foram divididos de acordo com o estágio de maturação (imaturos-verde e maduros-vermelho). A quantidade de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu e o resultado foi expresso como mg/100g equivalentes de ácido clorogênico (EAC). A atividade antioxidante *in vitro* foi analisada pelo ensaio do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e índice da reatividade antioxidante total (TAR) e em um modelo *ex vivo*. A atividade antimicrobiana dos extratos foi investigada pelo método de difusão em disco. Os teores de fenólicos totais dos extratos variaram de 1523,9 a 7688,1 mg de EAC/100g. Os EAC foi maior nos respectivos extratos: placenta imatura e sementes maduras quando comparados com as outras as partes. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *ex vivo* demonstram que os extratos testados apresentam atividade antioxidante, sendo que esta atividade poderia estar relacionada com o teor de fenólicos presentes nos extratos. Os resultados obtidos demonstram que ocorreu uma modificação na composição química e na atividade antioxidante nos frutos de *C. baccatum* provavelmente relacionada com o processo de maturação. Os extratos apresentaram fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Many epidemiological studies have indicated an inverse association between dietary intake of fruits and vegetables rich in phenolic compounds and the risk of chronic diseases related to oxidative stress. Peppers (*Capsicum sp*) are popularly used as spices and vegetable foods, and are a remarkable source of antioxidants compounds, but levels of these phytochemicals may vary by genotype and maturity. *Capsicum baccatum* (cambuci) is widely used in the South of Brazil and there are few studies in literature concerning its chemical composition and biological properties. The objective of this study was evaluated the antioxidant and antimicrobial properties of hydroethanolic extracts of different parts from *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. fruits. The hydroethanolic extracts were obtained from three different parts (pericarp, placenta and seeds) of the *C.baccatum* fresh fruits, divided in accordance with their maturity stage (immature - green and mature - red). The amounts of total phenolic compounds were determined by Folin-Ciocalteu method and the results were expressed as mg/100g chlorogenic acid equivalent (CAE). The antioxidant activity of extracts was evaluated *in vitro* by the antioxidant potential reactive total (TRAP) assay and TAR index and *ex vivo* model. The antimicrobial activity of extracts was investigated by disk diffusion method. The total phenolic levels ranged 1523.9 at 7688.1 mg de CAE/100g. The CAE found was higher in the respective extracts: placenta from immature fruits and seeds from mature fruits as compared to extracts from other structures. The results of *in vitro* e *ex vivo* assays demonstrated that the extracts tested have antioxidant activity, this could be related with the total phenolic content in extracts. The results obtained suggest that a modification occurs in the chemical composition and antioxidant properties of *C. baccatum* fruits probably related with their maturation process. The extracts showed weak or no antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> – Foto da flor de <i>C. baccatum</i> .....	04
<b>Figura 2</b> – Foto do fruto da pimenta Cambuci ( <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> ).....	04
<b>Figura 3</b> – Estrutura química de alguns dos capsaicinóides.....	05
<b>Figura 4</b> – Estrutura dos ácidos benzóicos ( <b>A</b> ) e ácidos cinâmicos ( <b>B</b> ).....	10
<b>Figura 5</b> – Estrutura das cumarinas.....	10
<b>Figura 6</b> – Estrutura básica dos flavonóides.....	11

### ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Figura 1</b> – Perfil do CLAE (280 nm) dos extratos das partes dos frutos de <i>C. baccatum</i> .....	41
<b>Figura 2</b> – Perfil do TRAP das partes imaturas ( <b>A</b> ) e maduras ( <b>B</b> ) dos frutos de <i>C. baccatum</i> .....	42
<b>Figura 3</b> – Índice de TAR (Io/I) das partes dos frutos de <i>C. baccatum</i> durante diferentes estádios de maturação.....	43
<b>Figura 4</b> - Correlação entre o conteúdo de fenólicos totais (EAC) e o índice TAR (Io/I) dos extratos das partes dos frutos de <i>C. baccatum</i> .....	44
<b>Figura 5</b> – Efeito dos extratos da placenta imatura e semente madura nos níveis de TBARS.....	45



**LISTA DE TABELAS****INTRODUÇÃO**

<b>Tabela 1</b> - Principais espécies redoxi-ativas.....	07
--	----

**ARTIGO CIENTÍFICO**

<b>Tabela 1</b> - Conteúdo de fenólicos totais em diferentes partes dos frutos de <i>C. baccatum</i> em diferentes estádios de maturação.....	38
---	----

<b>Tabela 2</b> - Atividade antimicrobiana do extrato das sementes imaturas de <i>C. baccatum</i> .....	39
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH = 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) diidrocloreto

BSA = Albumina sérica bovina

EAC (CAE) = Equivalentes de ácido clorogênico

CAT = Catalase

CLAE (HPLC) = Cromatografia líquida de alta eficiência

EROs = Espécies reativas de oxigênio

ERNs = Espécies reativas de nitrogênio

GPx = Glutathione peroxidase

GSH = Glutathione reduzida

MDA = Malondialdeído

MeOH = Metanol

QL (CL) = quimiluminescência

SOD = Superóxido dismutase

TAR = Reatividade antioxidante total

TCA = ácido tricloroacético

TBA = ácido tiobarbitúrico

TBARS = Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP = Potencial antioxidante reativo total

TROLOX = ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico

*t*-BOOH = *tert*-butil hidroperóxido

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 <i>Capsicum</i> spp.....	01
1.1.1 <i>Capsicum baccatum</i> .....	03
1.1.2 Aspectos químicos.....	04
1.1.3 Aspectos biológicos.....	06
1.2 Espécies redoxi-ativas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo.....	06
1.3 Compostos Fenólicos.....	09
1.4 Atividade antimicrobiana.....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	16
3.1 Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fruits of <i>Capsicum baccatum</i> L. var. <i>pendulum</i> at Different Maturity Stages.....	17
<b>4. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	46
4.1 Atividade antioxidante e compostos fenólicos.....	46
4.2 Atividade antimicrobiana.....	48
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	51
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Capsicum* spp

As espécies do gênero *Capsicum* são popularmente conhecidas como pimentas e pimentões. Este gênero, originário do continente Americano, é pertencente à família *Solanaceae* e possui pelo menos 25 espécies descritas. Dentre estas espécies do gênero de *Capsicum*, cinco são domesticadas e amplamente utilizadas e cultivadas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*) e três são semi-domesticadas (*C. annuum* var. *glabriusculum*; *C. baccatum* var. *praetermissum*. *C. baccatum* var. *baccatum*) (CARVALHO e BIANCHETTI, 2004; ESHBAUGH, 1993).

As pimentas são, em termos botânicos, frutos do tipo baga, que apresentam múltiplas formas, tamanhos, colorações e pungência. A coloração do fruto imaturo é verde e do maduro, geralmente, é vermelha, mas pode variar desde o amarelo, alaranjado, roxo até o preto. O formato também varia entre as espécies e dentro delas, existindo frutos alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, campanulados, quadrados ou retangulares. Desta forma, a taxonomia das espécies do gênero *Capsicum* é muito difícil, devido à complexidade e a grande diversidade entre as espécies e variedades, sendo que elas podem ser identificadas por características morfológicas visualizadas principalmente nas flores (CARVALHO e BIANCHETTI, 2004).

Pimentas e pimentões comumente são divididos em dois grupos de acordo com o grau de pungência, pungentes (picantes) e não-pungentes (doces). Essa característica se dá pela presença de capsaicinóides, principalmente a capsaicina, um alcalóide exclusivo do gênero *Capsicum*, que se acumula na superfície da placenta (tecido localizado na

parte interna do fruto), e é liberada quando o fruto sofre qualquer dano físico e pode ser medida em Unidades de Calor Scoville ('Scoville Heat Units-SHU') por meio de aparelhos específicos. O valor SHU pode variar de zero (pimentas doces) a 300.000 (pimentas muito picantes) dependendo dos fatores bióticos e abióticos (CARVALHO e BIANCHETI, 2004).

As espécies do gênero *Capsicum* apresentam grande relevância econômica, pois estão dominando o comércio das especiarias picantes em vários países de clima tropical, sub-tropical e temperado. As pimentas são cultivadas em diferentes partes do mundo, mas os principais produtores são a Índia e a China e os maiores consumidores são os tailandeses e os coreanos, que em média consomem até 8 gramas por pessoa/dia (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2004; THAMPI, 2003).

O Brasil também se destaca na produção de *Capsicum*, sendo considerados importantes produtos do agronegócio brasileiro. O cultivo de pimentas incentiva a agricultura familiar, como alternativa de diversificação da produção, aumentando a geração de emprego e a renda na agricultura do país (VILELA, 2004). Os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul e a produtividade média varia de 10 a 30 toneladas por hectares (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2004).

O Brasil possui uma ampla diversidade de espécies de *Capsicum*, incluindo quatro espécies domesticadas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens*) (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2004). *Capsicum annuum* var. *annuum*, pimentão, é a variedade mais conhecida e difundida no mundo, esta espécie apresenta uma baixa pungência sendo considerada uma pimenta doce (BOSLAND et al., 1996; ESHBAUGH, 1993).

### 1.1.1 *Capsicum baccatum*

*Capsicum baccatum* é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul, inclusive no Brasil, é popularmente conhecida como “aji” e apresenta tipos com diferenças morfológicas. Esta espécie tem duas variedades principalmente reconhecidas *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *pendulum*. No Brasil a variedade *C. baccatum* var. *baccatum* é popularmente conhecida como pimenta ‘Cumari’ e a *C. baccatum* var. *pendulum* dependendo das características dos frutos pode ser chamada de pimenta ‘dedo-de-moça’ ou pimenta ‘cambuci’ (chapéu-de-bispo). Neste grupo de pimentas, a pungência dos frutos é menos intensa, há inclusive cultivares de pimenta ‘Cambuci’ que são doces (BOSLAND et al., 1996; ESHBAUGH, 1993; RIBEIRO, 2004).

*C. baccatum* var. *pendulum* é uma das espécies domesticadas no Brasil e muito cultivada e utilizada no sudeste e sul do Brasil. As flores são isoladas, pequenas, hermafroditas e se apresentam em número de uma a duas por nó. Na antese, os pedicelos são geralmente eretos. A corola é branca e sempre apresenta um par de manchas amareladas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas e as anteras são amarelas (Figura 1). Os cálices dos frutos maduros são evidentemente dentados e não possuem constrição anelar na junção do pedicelo. Os frutos são de várias cores e formas (Figura 2), geralmente pendentes, persistentes, com polpa firme e as sementes apresentam cor de palha (CARVALHO e BIANCHETTI, 2004).



**Figura 1** – Foto da flor de *C. baccatum*

Fonte: EMBRAPA HORTALIÇAS <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.htm>>



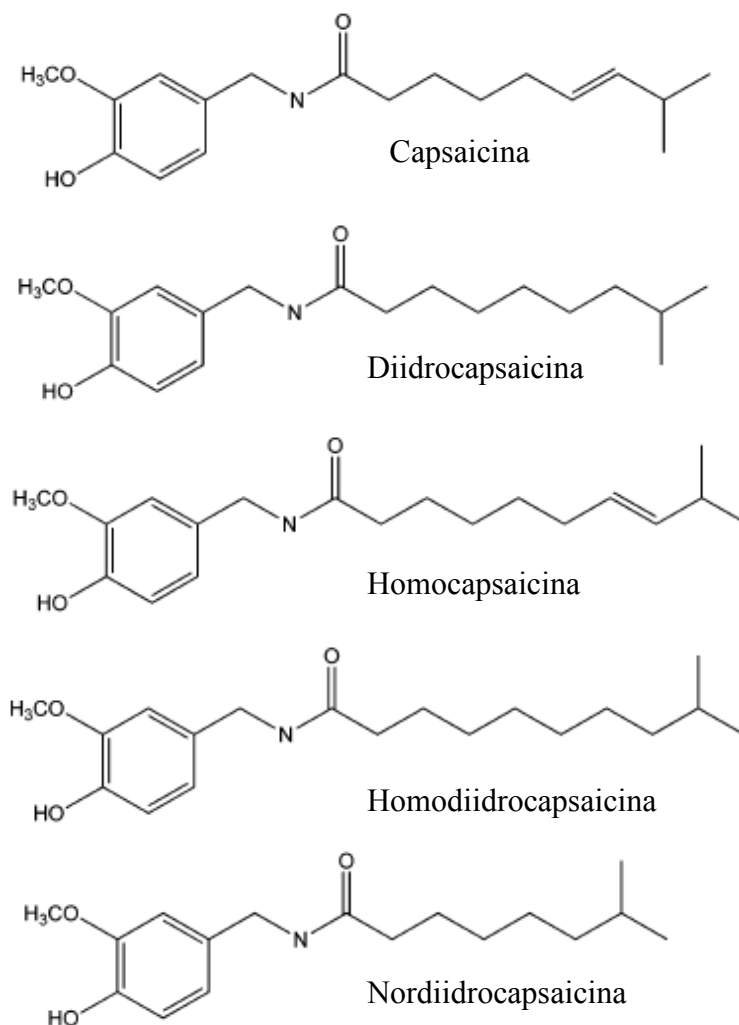
**Figura 2** – Foto do fruto da pimenta Cambuci (*C. baccatum* var. *pendulum*)

Fonte: EMBRAPA HORTALIÇAS <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/epimentacambuci.htm>>

### 1.1.2 Aspectos químicos

As pimentas apresentam uma diversidade em sua composição química, entre os principais componentes destacam-se os capsaicinóides, os carotenóides e o ácido ascórbico. Além destes, também se encontram os compostos fenólicos, vitamina A e tocoferóis, sendo que estes níveis de compostos podem variar de acordo com o genótipo e grau de maturação (DAVIS et al., 2007; DELI et al., 2001; HOWARD et al., 2000; MARIN et al., 2004; MIEAN e MOHAMED, 2001).

Os capsaicinóides (Figura 3) são os compostos mais estudados das pimentas e são amidas da vanilamina (4-hidróxi-3-metóxi-benzilamina) e ácidos graxos saturados ou insaturados. Este grupo apresenta mais de 10 compostos conhecidos, porém a capsaicina {*N*-[(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)metil]-8-metilnon-6-enamida} é a mais descrita (CARVALHO et al., 1999; DAVIS et al., 2007).



**Figura 3** – Estrutura química de alguns dos capsaicinóides. Fonte: DAVIS et al.(2007)

No entanto, como nem todas as espécies de pimentas apresentam grandes concentrações de capsaicinóides, recentemente alguns trabalhos enfocam a pesquisa na quantificação e isolamento de compostos fenólicos e suas atividades biológicas, principalmente as propriedades antioxidantes destas substâncias (MATERSKA e PERUCKA, 2005; MIEAN e MOHAMED, 2001).

Materska e Perucka (2005) relataram a presença de, além dos capsaicinóides, flavonóides e ácidos fenólicos em cinco cultivares de *C. annuum* L. Corroborando com este achado, Miean e Mohamed (2001) separaram e quantificaram flavonóides, principalmente quercetina e miricetina, também da espécie *C. annuum*.



### 1.1.3 Aspectos biológicos

Os capsaicinóides, além de definirem a pungência das pimentas, apresentam uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antioxidante, anticâncer e analgésica (CICHEWICZ e THORPE, 1996; CHOWDHURY et al., 1996; MOLINA-TORRES et al., 1999; ROSA et al., 2002; SURH, 2002).

Por outro lado, a presença de níveis moderados a altos de fenólicos é indicada como a principal responsável pelas atividades biológicas das pimentas. Esses fitoquímicos são sabidamente descritos como antioxidantes. Alguns estudos que relatam a capacidade antioxidante de espécies de *Capsicum* correlacionam positivamente essa atividade com o conteúdo dos fenólicos (MATERSKA e PERUCKA, 2005; SHAN et al., 2005).

### 1.2 Espécies redoxi-ativas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo

O estudo de antioxidantes e estresse oxidativo nos últimos anos têm revelado um grande interesse, principalmente, nos efeitos das espécies reativas nos sistemas biológicos. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, geralmente formados pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução). Esses radicais livres que possuem o elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Espécie redoxi-ativas é um termo geral que inclui as espécies reativas de oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio, que podem ser observadas na Tabela 1 (HALLIWELL, 2001).

**Tabela 1.** Principais espécies redoxi-ativas.

<b>ESPÉCIES REDOXI-ATIVAS DE OXIGÊNIO</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
ânion superóxido ( $O_2^-$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxila ( $OH^\bullet$ )	Ácido hipocloroso (HClO)
Peroxila ( $RCO_2^\bullet$ ou $LOO^\bullet$ )	Ácido hipobromoso (HBrO)
Alcoxila ( $RO^\bullet$ ou $LO^\bullet$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Hidroperoxila ( $HO_2^\bullet$ )	Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )
<b>ESPÉCIES REDOXI-ATIVAS DE NITROGÊNIO</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Óxido nítrico ( $NO^\bullet$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Dióxido de nitrogênio ( $NO_2^\bullet$ )	Alquil peroxinitrito (ROONO)

Fonte: adaptado de HALLIWELL, 1996.

Em sistemas biológicos, as espécies redoxi-ativas são formadas naturalmente ou devido alguma alteração fisiológica. Elas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos importantes, tais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização celular e síntese de substâncias. Entretanto, o excesso de radicais livres pode gerar efeitos prejudiciais, podendo ser a etiologia e/ou patogênese de várias patologias, como câncer, catarata, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre outras (BARREIROS et al., 2006).

Para impedir os efeitos deletérios associados ao excesso das espécies redoxi-ativas o organismo apresenta defesas antioxidantes. Segundo Halliwell (2001), define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os antioxidantes presentes no organismo podem ser de origem

endógena agindo enzimaticamente, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), ou não-enzimaticamente, como glutathione reduzida (GSH). Além destes antioxidantes produzidos no organismo, têm os antioxidantes oriundos da dieta, tais como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ascorbato (vitamina C), compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (BARREIROS et al., 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Em condições normais, o sistema das defesas antioxidantes atua em diferentes níveis e mantém as reações de formação de espécies redoxi-ativas sob controle. Desta forma, o organismo apresenta um equilíbrio entre as espécies redoxi-ativas e as defesas antioxidantes. Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante / antioxidante, no sentido da situação pró-oxidante, ocorre um dano potencial que caracteriza o estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SIES, 1993).

As espécies redoxi-ativas podem reagir com biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos. Assim, o estresse oxidativo pode resultar em três diferentes processos: I) adaptação por regulação do sistema de defesa antioxidante; II) injúria tecidual; III) morte celular por apoptose (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Todos os componentes celulares estão expostos às espécies redoxi-ativas, sendo que os ácidos graxos poliinsaturados das membranas são os mais vulneráveis desencadeando uma série de reações denominadas de peroxidação lipídica (lipoperoxidação, LPO). Este processo de oxidação lipídica leva a alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana celular, conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas (como enzimas hidrolíticas dos lisossomas), formação de produtos citotóxicos (como malondialdeído, MDA),

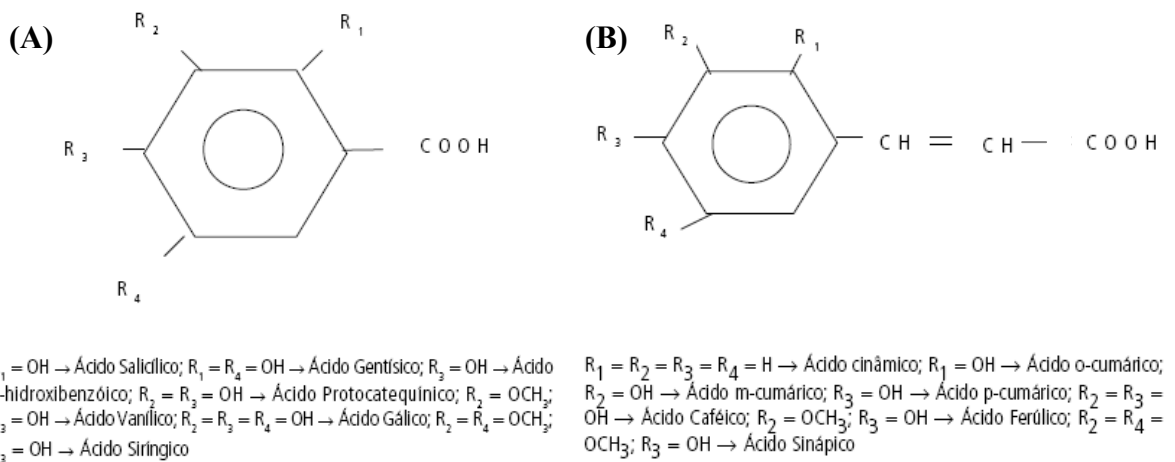
culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007).

A lipoperoxidação é utilizada como um sinal do estresse oxidativo celular e auxilia no reconhecimento de danos oxidativos em organismos com algumas patologias, ocorrendo numa seqüência de reações já conhecida. Inicialmente, um átomo de hidrogênio é seqüestrado do ácido graxo contendo, ao menos, duas duplas ligações separadas por metilenos intercalados (LH), originando um radical livre centrado no carbono (radical lipídico) ( $L^{\bullet}$ ) com um rearranjo das duplas ligações (conjugação de dienos). Esta fase é seguida pela interação do  $L^{\bullet}$  com o oxigênio molecular ( $O_2$ ), para formar um radical peroxila ( $LOO^{\bullet}$ ), que pode então retirar um átomo de hidrogênio tanto do LH adjacente (induzindo uma reação de propagação), como de outro doador de hidrogênio como, por exemplo, um antioxidante. Em ambas as circunstâncias, um hidroperóxido de ácido graxo ( $LOOH$ ) é formado (ERNSTER e HOCHSTEIN, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HERMES-LIMA et al., 1995).

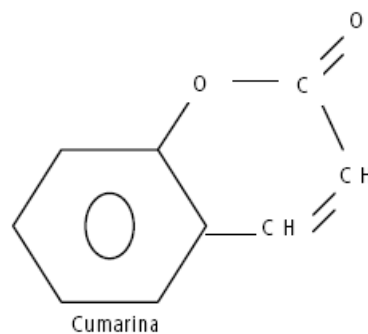
### **1.3 Compostos Fenólicos**

Compostos fenólicos são compostos que, no mínimo, apresentam em sua estrutura um anel aromático substituído por um ou mais grupamentos hidroxila. No entanto, é uma classe que inclui grande diversidade de estruturas, simples e complexas. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Desta forma, os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogenéticas: pela via do ácido chiquímico ou pela via do acetato-polimalato (BRAVO, 1998; CARVALHO et al., 1999).

Os ácidos fenólicos são alguns compostos que constituem a classe dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na estrutura da molécula. Os ácidos fenólicos se dividem em três grupos: ácidos benzóicos - sete carbonos, C6-C1 (Figura 4A), ácidos cinâmicos - nove carbonos, C6-C3 (Figura 4B) e cumarinas (Figura 5) (SOARES, 2002).



**Figura 4** – Estrutura dos ácidos benzóicos **(A)** e ácidos cinâmicos **(B)**. Fonte: SOARES (2002).

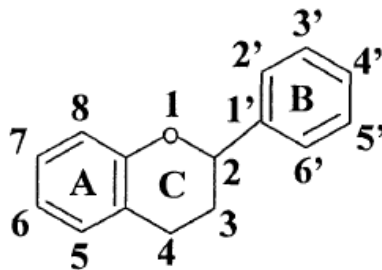


**Figura 5** – Estrutura das cumarinas. Fonte: SOARES (2002).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes, pertencendo a classe de polifenóis, ou seja, tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, glicosídeos). A família inclui as antocianidinas, flavonóis, flavanóis, flavanonas e

flavonas. Entre os metabólitos secundários de vegetais estes compostos aparecem com relativa abundância (RICE-EVANS et al., 1996; ZUANAZZI, 1999).

A maioria dos representantes de flavonóides possui 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) em seu núcleo fundamental (Figura 6), o qual se constitui de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Quando o composto está na forma conjugada com açúcares é conhecido como heterosídeo, e sem o açúcar (forma livre) é chamado de aglicona ou genina (COOK e SAMMAN, 1996; ZUANAZZI, 1999).



**Figura 6** – Estrutura básica dos flavonóides. Fonte: COOK e SAMMAN (1996).

Muitos estudos têm evidenciado a capacidade *in vitro* dos polifenóis em quelar metais e seqüestrar espécies redoxi-ativas, caracterizando estes compostos como antioxidantes de ocorrência natural. A habilidade dos compostos fenólicos em agir como antioxidantes é devido à capacidade de doar elétrons e é dependente de suas estruturas químicas (RICE-EVANS et al., 1996).

Atualmente, existe um interesse crescente nos fitoquímicos como componentes bioativos dos alimentos, onde o papel das frutas, vegetais e vinho tinto na prevenção de doenças tem sido atribuído em parte a propriedade antioxidante de seus constituintes polifenólicos. E muitos destes, são antioxidantes mais efetivos *in vitro* que as vitaminas E e C, e desta forma, podendo contribuir significativamente para o efeito protetor *in vivo* (RICE-EVANS et al., 1997).

Estudos epidemiológicos confirmam que uma dieta composta de alimentos ricos em polifenóis está associada com a prevenção de várias patologias. Este resultado

poderia ser justificado devido aos efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos, protegendo o organismo de várias doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como, câncer e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além das evidências dos estudos epidemiológicos, os efeitos antioxidantes são confirmados em teste *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em animais, porém estudos com humanos ainda são limitados e controversos (HERTOG et al., 1995; PIETTA, 2000; SCALBERT et al., 2005).

Outras atividades são descritas para os compostos fenólicos como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antitrombótica, antia-alérgica entre outras (COOK e SAMMAN, 1996; GRYGLEWSKI et al., 1987; HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON e KANDASWAMI, 1992).

#### **1.4 Atividade antimicrobiana**

O tratamento com antibióticos, denominado antibioticoterapia, foi iniciado na década de 1930 por Alexander Fleming, que a partir do fungo *Penicillium* descobriu a penicilina, seguido de muitos outros estudos que induziram a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana. No entanto, as investigações e os estudos sobre o uso de substâncias com atividade antimicrobiana foram conduzidos de forma mais científica por Louis Pasteur e Robert Koch, através de descobertas das etiologias microbianas das infecções (LIMA, 2001).

A farmacoterapia nos últimos cinquenta anos apresentou um grande avanço, o qual pode ser representado pelos antibióticos. Esse grupo de medicamentos possibilita o controle efetivo de muitos microorganismos patogênicos através de vários mecanismos (DI STASI, 1996).

Apesar da evolução química e farmacológica dos agentes antimicrobianos, o uso indiscriminado de antibióticos resultou no aparecimento de patógenos multirresistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos fármacos, ampliando a importância da pesquisa por novos agentes antimicrobianos (FALCÃO et al., 2002).

Uma das principais fontes de investigação na busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano são as espécies vegetais, visto que possuem como principal mecanismo de defesa contra seus predadores (fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores) a produção de compostos originados das vias metabólicas secundárias das plantas. Estes compostos, por possuírem estruturas químicas complexas, são bastante diferenciados dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos (LIMA, 2001).

Os antimicrobianos, de acordo com o efeito que causam nos microorganismos, podem ser classificados como bactericidas e fungicidas ou bacteriostáticos e fungistáticos. O primeiro grupo destrói os microorganismos e o segundo grupo inibe seu crescimento (MACHADO e BARROS, 2001; ZACCHINO, 2001).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos pode se apresentar de diversas maneiras, ou seja, interferindo em processos metabólicos ou estruturas do microrganismo. De modo geral, os pontos de ação incluem a parede celular bacteriana; a membrana citoplasmática e a síntese de ácido nucléico e proteínas (MACHADO e BARROS, 2001; PELCZAR et al., 1996).

Os vegetais, assim como os microorganismos, são capazes de elaborar e produzir substâncias com potencial antimicrobiano, visto que suas propriedades bacteriostáticas e bactericidas têm sido comprovadas através de diversos trabalhos na literatura. Porém, o mecanismo de ação de produtos oriundos de plantas ainda é pouco conhecido, principalmente pelo fato de que estas atividades geralmente são avaliadas e confirmadas



através de ensaios biológicos *in vitro* (testes de susceptibilidade ou sensibilidade) incluindo os métodos de diluição em tubos e difusão em meio sólido – disco, cavidade, cilindro (COWAN, 1999; LIMA, 2001, RAUHA et al., 2000).

Alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana de substâncias naturais demonstram que estas podem atuar na inibição da parede celular ou da síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), interferindo na formação de purina ou pirimidina ou bloqueando a polimerização dos nucleotídeos (LIMA, 2001).

Vários metabólitos secundários das plantas são investigados em relação as suas propriedades antimicrobianas. Dentre estes se destacam os flavonóides, os quais provavelmente apresentam atividade antimicrobiana devido à capacidade de complexar proteínas extracelulares solúveis e células da parede bacteriana (COWAN, 1999; FALCÃO et al., 2002).

As bactérias de interesse médico podem ser classificadas com base em suas características fenotípicas. Entre estas, estão as bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp) ou gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) as quais são coradas pelo método de Gram, apresentando-se em forma de cocos ou de bacilos. Muitas dessas bactérias são patogênicas e outras fazem parte da microbiota normal do corpo humano (TRABULSI, 1999).

As infecções fúngicas, nas últimas décadas, tornaram-se importantes causas de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Assim, fungos oportunistas como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoforms* são mais comumente encontrados causando enfermidades e freqüentemente de difícil erradicação, sendo necessário o desenvolvimento de novos e efetivos agentes antifúngicos (MIRANDA et al., 2003; ZACCHINO et al., 1998).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de diferentes partes (pericarpo, semente, placenta) dos frutos de *Capsicum baccatum* L.var. *pendulum*

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos das partes de frutos de *C. baccatum* utilizando o ensaio do potencial antioxidante reativo total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR);
- Determinar o conteúdo total dos fenólicos dos extratos das partes de frutos de *C. baccatum* através do método de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar os efeitos dos extratos das partes de frutos de *C. baccatum* na peroxidação lipídica em homogenato de fatias de fígado de ratos em um modelo *ex vivo*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos das partes de frutos de *C. baccatum* através do método de triagem de difusão em disco;
- Correlacionar o conteúdo total de fenólico com a atividade antioxidante.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto no mesmo formato que foi aceito para publicação no periódico *Journal of Medicinal Food*.

**3.1** Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at Different Maturity Stages.

Artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Medicinal Food*

**Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at Different Maturity Stages.**

Virginia D. Kappel<sup>1\*</sup>; Geison M. Costa<sup>2</sup>; Gustavo Scola<sup>3</sup>; Francilene A. Silva<sup>4</sup>; Melissa F. Landell<sup>5</sup>; Patrícia Valente<sup>5</sup>; Daiana G. Souza<sup>6</sup>; Danielli C. Vanz<sup>6</sup>; Flávio H. Reginatto<sup>2,6</sup>; José C. F. Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Curso de Farmácia, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Brazil

\* Corresponding author

Address: Av. Ramiro Barcelos, 2600 – anexo

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Tel. (55) (51) 3308-5578

Fax. (55) (51) 3308-5535

E-mail: [virginiadkappel@yahoo.com.br](mailto:virginiadkappel@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

The phenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activity of extracts of different parts of the fruit from *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* were investigated. The analysis of phenolic content was performed by Folin-Ciocalteu method and reversed-phase HPLC. The *in vitro* antioxidant activity was assessed by the total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) index. The antioxidant activity was positively correlated with the amount of phenolics found in each sample. The *ex vivo* antioxidant potential was carried out using rat liver slices model. The antimicrobial activity was screened using Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. All the extracts revealed antioxidant activity and a weak antimicrobial activity.

**KEYWORDS:** antioxidant potential; antimicrobial activity; *Capsicum*; maturity; phenolics

## INTRODUCTION

Many epidemiological studies have indicated an inverse association between a plant-based diet and the risk of development of chronic pathological processes associated with oxidative stress, including cancer, cardiovascular diseases, and other age-related degenerative disorders.<sup>1-3</sup> The presence of antioxidant compounds in fruits and vegetables could be associated with these beneficial health effects, protecting biomolecules from oxidative damage. Regarding plant components, phenolic compounds, or polyphenols, are an important group of secondary metabolites that have been widely investigated concerning their antioxidant potential.<sup>4-7</sup> These phytochemicals may act as antioxidants because they demonstrate redox properties, which allow them to scavenge free radicals and inactivate other pro-oxidants.<sup>8</sup> Furthermore, the antimicrobial activity of these compounds also has been reported.<sup>9,10</sup>

Recently, several researchers have investigated the chemical composition and antioxidant activity of different fruits and vegetables.<sup>11-13</sup> Peppers, *Capsicum* species (Solanaceae), are native plants of America and are important vegetables popularly used as spices, foods, and external medicine. Pepper fruits are a remarkable source of antioxidant compounds, like vitamins.<sup>14,15</sup>, carotenoids<sup>16-18</sup>, capsaicinoids<sup>19-22</sup>, and phenolic compounds<sup>23-25</sup>, but levels of these phytochemicals may vary by genotype, stage of maturity and plant part consumed. Thus, it becomes pertinent to study these variations in different parts of the fruit from different genotypes during maturity to select the best for health benefits.

*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Cambuci) is widely consumed in South Brazil and there are few studies in literature concerning its chemical composition and biological properties. The objectives of this study were **(1)** to determine the total phenolic content of extracts of three different parts of *C. baccatum* L. var. *pendulum* immature and mature fruits;

(2) to evaluate and compare total antioxidant capacity and phenolic content of these extracts; (3) to establish the relationship between antioxidant activity and phenolic compounds of extracts; (4) to identify the phenolic profile of the extracts by RP-HPLC; and (5) to determine the antimicrobial activity of these extracts.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Thiobarbituric acid (TBA), luminol (3-aminophthalhydrazide), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), bovine serum albumin (BSA) and standard chemicals of capsaicin, galic, chlorogenic and caffeic acids, and rutin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). The acetonitrile, acetic acid, methanol, and glycine were purchased from Nuclear (Diadema, SP, Brazil). Folin-Ciocalteu reagent was purchased from Merck (Germany). Trichloroacetic acid (TCA) and sodium carbonate were purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil).

### Plant material

The fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* were collected in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil, in January 2006. Voucher specimens were identified by Prof. MS Branca Severo from the University of Passo Fundo and are on deposit in the Herbarium of the Museu Zoobotânico Augusto Ruschi of the University of Passo Fundo, RS, Brazil (RSPF 10449).



### **Preparation of the extracts**

The fresh fruits of *C. baccatum* were divided based on their color into two maturity stages (immature - green and mature - red) and separated in three different parts (pericarp, seeds and placenta). Ten grams of each structure were separately extracted using 100 mL of 40% ethanol (plant:solvent, 1:10, w/v) under reflux (80 °C) during 30 min. After cooling, the extracts were filtered, evaporated under reduced pressure to dryness and stored at -20 °C until use. During their preparation and analysis, extracts were protected against light.

### **Determination of total phenolics content**

Total phenolic content of the hydroethanolic extracts was determined by the Folin–Ciocalteu assay and chlorogenic acid was used as standard.<sup>26</sup> Briefly, a 100 µL aliquot of extracts was assayed with 100 µl of Folin–Ciocalteu reagent and 200 µL of sodium carbonate (25%, w/v). The mixture was vortexed and diluted with distilled water to a final volume of 2 mL. After 2 h, the absorption was measured at 726 nm and the total phenolic content was expressed as chlorogenic acid equivalents in mg/100g of dry weight (CAE mg/100g DW).

### **HPLC Analysis**

The qualitative analysis of some phenolic compounds and capsaicin from extracts was made by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu liquid chromatography apparatus (Columbia, MD) composed of two LC-10AD pumps, a SPD-10AV UV/Vis detector, a SCL-10A controller and a Rheodyne injector (20 µL sample loop). The data acquisition system was a Class-VP software. The separation was achieved on Waters Spherisorb ODS-2 column (RP-C18, 5 µm particle size, 150 x 4.6 mm i.d.). A linear gradient with eluents A (MeOH) and B (water/acetic acid, 99/1, v/v) as the mobile phase was used as follows: 0 min, 15% A; 15 min, 40% A and 25 min, 50% A. The mobile phase was prepared

daily and degassed by sonication before use. The flow rate was 1 mL/min and the chromatograms were recorded at 280 nm. The phenolic compounds were identified by comparing the retention time with reference standards and by co-injection of standards by adding them to the extracts. For this, 500  $\mu$ L of mobile phase or aqueous solution containing chlorogenic or caffeic acid or rutin (all 200  $\mu$ g/mL) were added to 500  $\mu$ L of the crude extract solution (1000  $\mu$ g/mL). Capsaicin analyses were conducted by the same HPLC apparatus but the mobile phase was isocratic, consisting of 65% solvent A (MeOH) and 35% B (acetic acid 1%), at a flow rate of 1 mL/min and detection at 280 nm. The presence of capsaicin was determined based on the retention time of a standard solution.

### **Antioxidant activity**

The *in vitro* antioxidant activity of the extracts was estimated by the total reactive antioxidant potential (TRAP) and the total antioxidant reactivity (TAR), as previously described.<sup>27-29</sup> Briefly, the reaction mixture (4 mL), containing AAPH (10 mM) and luminol (4 mM) in glycine buffer (0.1 M), pH 8.6, was incubated at 21 °C for 2 h. AAPH is a source of peroxy radicals that react with luminol yielding chemiluminescence (CL). The system was calibrated using the  $\alpha$ -tocopherol synthetic analogue, Trolox. The addition of 10  $\mu$ L of the extracts (final concentration 2.5  $\mu$ g/mL) or of 10  $\mu$ L of Trolox (final concentration 200 nM) decreases the CL proportionally to its antioxidant potential. The TRAP profile was obtained measuring the CL emission in a liquid scintillation counter (Wallac 1409), operating in the 'out of coincidence' mode, as counts per minute (CPM). The CL intensity was monitored for 50 min after the addition of the extracts or Trolox. The TAR index was determined by measuring the initial decrease of luminol luminescence calculated as the ratio  $I_0/I$  where  $I_0$  is the initial emission of CL (before the addition of the antioxidant) and  $I$  is the instantaneous CL intensity after addition of an aliquot of the sample or the reference compound (Trolox).

### ***Ex vivo* assay**

The antioxidant activity of *C. baccatum* parts extracts was also evaluated in an *ex vivo* assay using *t*-BOOH (*tert*-butyl hydroperoxide) as oxidative stress inducer. Rat liver slices (400  $\mu$ m) were preincubated with the extracts for 30 min at 37 °C under 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath (60 oscillations/min) in a medium of oxygen-equilibrated Krebs-Ringer phosphate buffer (10 mM glucose, pH 7.4). After this incubation with the treatments, 0.5 mM *t*-BOOH was added to different liver slice samples. After incubation, rat liver slices were removed and the medium was centrifuged at 12000g for 10 min. The supernatant portion was used to measure lactate dehydrogenase activity using a commercial kit (LDH Liquiform™, Brazil). For lipid peroxidation assay, the rat liver slices were homogenized with phosphate buffer, pH 7.4, and kept at -75 °C prior to analysis.

### **Lipid peroxidation**

Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) formation was used to evaluate lipid peroxidation.<sup>30</sup> First, 600  $\mu$ L of 15% trichloroacetic acid were added to 300  $\mu$ L of the liver slice homogenates and centrifuged at 7000g for 10 min. Then, 500  $\mu$ L of supernatant were mixed with 500  $\mu$ L of 0.67% thiobarbituric acid. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 20 min, cooled to room temperature and the absorbance read at 532 nm. The results were normalized by protein content and were expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein). Protein concentration in rat liver slice homogenates was measured by Lowry method, using bovine serum albumin as standard.<sup>31</sup>

### **Antimicrobial assays**

The disk diffusion method was used as screening test for antimicrobial activity.<sup>32</sup> Filter-paper disks (6 mm in diameter) impregnated with extract solutions were placed on Mueller-Hinton agar plates (Merck, Darmstadt, Germany), which were inoculated with test organisms according to the standard protocol described by the National Committee of Clinical Laboratory Standards – NCCLS 2004.<sup>33</sup> The filter-paper disks were impregnated with 20  $\mu$ L of the extract solutions in order to obtain final concentrations of 2000, 1000 and 200  $\mu$ g of extract in the disks. The microorganisms used for the biological evaluation were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506), *Enterococcus faecium* (ATCC 10541), *Candida glabrata* (NRRL Y-55), *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (IMUFERJ 50149), *Candida dubliniensis* (NRRL Y-17841), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Cryptococcus neoforms* (ATCC 24065B), and two clinic-isolated *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The plates were incubated at 35 °C ( $\pm$ 1 °C), and after 18 h the diameters of the inhibition zones were measured. Filter-paper disks containing sterile water without any test compound were negative control and no inhibition was observed. Standard antibiotic disks were selected according to the sensitivity of the bacteria tested. Thus, ampicillin (10  $\mu$ g), chloramphenicol (30  $\mu$ g), ceftazidin (30  $\mu$ g) and fluconazole (25  $\mu$ g) were used.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicates from two independent experiments. Differences between treatments were compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for approximately normally distributed variables. Pearson's correlation coefficient was used to test correlation between total phenolic content (CAE) and TAR index.

Data analyses were performed using the SPSS 13.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) and the statistical significance was set at the 0.05 level (two-tailed).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Total phenol content, antioxidant capacity, and relationship between TAR and CAE

Many studies have established that polyphenols present in foods inhibit oxidative stress due to their free radical scavenging activities *in vitro* and *in vivo*.<sup>34,35</sup> This way, the quantification of phenolics in fruits and vegetables is necessary to increase functional properties of these foods. Total phenolic content was quantified by using Folin-Ciocalteu phenol reagent. Although the Folin-Ciocalteu method could overestimate total phenolics, it is so far the only single and widely used method for estimating total phenolics.<sup>36</sup> The results of the total phenolic content of immature and mature parts of *C. baccatum* fruits range from 1523.9 to 7688.1 mg of CAE/100g of DW (Table 1).

The phenol content of *C. baccatum* parts presented similar or higher content of total phenolics than other *Capsicum* species.<sup>23,25,36,37</sup> An overview of the results shows that the total phenolic content of all parts is higher in immature fruits than in mature fruits. This trend in the total phenolic content for *C. baccatum* with maturity stage is in agreement with the trend reported by Marin et al.<sup>24</sup> for *C. annuum* L. cv. Vergasa (a variety of sweet pepper), where the green pepper had higher total phenol content than the red pepper. However, some studies have observed an increasing trend in total phenolics during maturity stage in other *Capsicum* cultivars.<sup>23,36</sup>

In addition, we observed a change in the location of the highest phenolic content during the maturing process, as we noticed that the highest level of phenolics in the immature parts was found in the placenta (7688.1 mg of CAE/100g) and in the mature parts in the seeds

(5847.2 mg of CAE/100g). Thus, we verify that the seeds are the parts that most contribute to the total phenolic content in the mature fruits of *C. baccatum* (Table 1). Seeds from various plant sources have been shown to be rich in phenolics and to contribute significantly to high phenolics content in the maturity stage. This was observed in one cultivar of *C. annuum* of which seeds had been removed and the total phenolic level decreased with maturity.<sup>13,23</sup> Thus, our results suggest a clear understanding of metabolic changes in phenolics during the maturation process, and a characterization of the phenolic profile of all separate parts of the fruit is necessary.

The phenolic compounds in the extracts under study were analyzed using RP-HPLC by comparison with authentic phenolic standards. The different co-injections – with extract + standards, extract + mobile phase and standards + mobile phase – allowed us to observe an increase in the peak area concerning the chlorogenic and caffeic acids, and rutin, suggesting that these compounds are present in the *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* fruits. Figure 1 displays HPLC profiles of all studied extracts. The analyses of pericarp extracts revealed different chemical profiles since only the immature pericarp presented phenolic compounds (caffeic acid and rutin). The profile of the other parts analyzed indicates the presence of chlorogenic and caffeic acids in all of them. However, capsaicin was not detected in any extracts analyzed, indicating that *C. baccatum* L. var. *pendulum* is a species that can be considered a “sweet” pepper, and this characteristic flavor makes it suitable for culinary preparation.

The total reactive antioxidant potential (TRAP) was determined using a method based on the quenching of luminol-enhanced chemiluminescence derived from the thermolysis of a water-soluble azo compound, AAPH, used as a reliable and quantifiable source of alkyl peroxy radicals.<sup>27,28</sup> This widely used assay has proved to be a simple, sensitive, and reproducible method that can be used to determine the antioxidant capacity in complex

mixtures such as plant extracts.<sup>29</sup> On the other hand, the TAR index was obtained from the initial decrease in the luminescence associated with the additive incorporation of the sample to the AAPH–luminol system and it indicates the initial reactivity of the sample when compared to Trolox.<sup>27-29</sup> Figure 2 shows the chemiluminescence (CL) profile obtained after addition of 10  $\mu$ l of Trolox (final concentration 200 nM), used as a standard, and the different extracts (final concentration 2.5  $\mu$ g/mL). This allowed us to compare the TRAP profiles and we observed that CL decrease following addition of the plant extracts is qualitatively different to that obtained when Trolox is used. These differences can be the result of efficient and inefficient antioxidants in the extracts. All the extracts studied were active in reducing the luminol-enhanced chemiluminescence, indicating the presence of compounds with peroxy scavenging properties. However, immature placenta and mature seed extracts showed the highest antioxidant activity, as observed in the instantaneous reduction of CL and maintenance of this activity during the period analyzed. The results of TAR index indicated that all extracts have antioxidant reactivity (Fig. 3), but the same extracts that showed better activity on TRAP profile revealed a significantly higher TAR index when compared to other parts in the same maturity stage. Figure 3 shows that TAR indexes of immature placenta and mature seeds were not statistically different ( $p < 0.05$ ) from TAR index of Trolox.

The results of total phenolic content basically coincided with those of total antioxidant capacity. In other words, the extracts that had high antioxidant activity showed a tendency towards high phenolic content. Thus, as in other studies that evaluated the correlations between the antioxidant capacity and phenolic profile of fruits and vegetables<sup>13,37-39</sup>, we found a positive significant correlation ( $r = 0.863$   $p < 0.05$ ) between total phenolic content and antioxidant capacity (TAR index) in all analyzed extracts (Fig. 4), indicating that the phenolic compounds might be the major contributors to the antioxidant activities of these extracts.

The marked difference observed in the total phenolic content between the immature and mature parts of *C. baccatum* fruits could be attributed to the fact that peppers suffer profound physiological and biochemical changes during the course of maturation, with the conversion of some phytochemicals, and this influences the antioxidant activity of these fruits.<sup>24,25,40</sup>

### ***Ex vivo* assay**

In our *ex vivo* model, we used rat liver slices, which represent a complete and heterogeneous system close to the physiological system, to study the peroxidative damage. The incubation of physiologically active liver slices with the inducer *t*-BOOH substantially increased cell death and the generation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). The peroxy radicals are important agents that mediate lipid peroxidation, causing damage to cell membranes.<sup>41</sup> In order to evaluate if the extracts with the highest *in vitro* antioxidant activity (immature placenta and mature seeds) were capable of inhibiting *ex vivo* oxidative stress, lipid peroxidation was assessed by means of an assay that determines the production of malondialdehyde (MDA) and related compounds in rat liver homogenates. The results obtained are shown in Figure 5. The results clearly show that incubation of rat liver slices in the presence of 0.5 mM *t*-BOOH caused a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the MDA equivalents content of the liver homogenate when compared to the basal liver homogenate. However, the extracts tested (final concentration 2.5 µg/mL) were significantly effective in reducing the MDA levels. Whereas the addition of an oxidative stress inducer (0.5 mM *t*-BOOH) in the incubation medium substantially increased cell death, the pre-treatment with immature placenta and mature seeds extracts prevented increase in cell death, evidenced by decreased LDH leakage when compared to control slices (data not shown). In accordance with our study, Oboh et al.<sup>40</sup> demonstrated that other *Capsicum* species (*C. annuum* and *C. chinese*) prevent lipid peroxidation in rat brain and this effect is probably due its higher total



phenolic content. In addition, several studies investigating the antioxidant activity of extracts rich in polyphenols have demonstrated protective effects against lipid peroxidation.<sup>42,43</sup>

### **Antimicrobial activity**

The antimicrobial screening of all extracts was carried out by the disk diffusion method. The extracts did not show antibacterial activity. This could be related to the absence of capsaicin in the extracts, since Molina-Torres et al.<sup>44</sup> demonstrated the antimicrobial activity of this compound. The immature seed extract was the only extract that showed antifungal activity (Table 2). Some studies demonstrated antimicrobial activity of compounds isolated from seeds of *Capsicum annuum* L.<sup>45,46</sup>

In conclusion, our study indicates that the fruit extracts of *C. baccatum* L. var. *pendulum* have *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity, which is related to total phenolic content, fruit part, and maturity stage. Therefore, this pepper could be considered a new source of natural antioxidants but further studies are needed to examine the potential use of these extracts in the prevention of pathologies.

## REFERENCES

1. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press; Oxford: New York, 2007.
2. Kris-Etherton, P.M.; Hecker, K.D., Bonanome, A.; Coval, S.M.; Binkoski, A.E.; Hilpert, K.F.; Griel, A.E.; Etherton, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of cardiovascular Disease and Cancer. *Am J Med* 2002; 113:71S–88S.
3. Stanner,S.A.; Hughes,J.; Kelly,C.N.M.; Buttriss, J. A review of the epidemiological evidence for the ‘antioxidant hypothesis’. *Public Health Nutr* 2003; 7:407–422.
4. Rice-Evans, C., Miller, N.J. Antioxidants – the case for fruit and vegetables in the diet. *Br Food J* 1995; 97:35-40.
5. Urquiaga, I.; Leighton, F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol Res* 2000; 33:55-64.
6. Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:215S–217S.
7. Kaur, C., Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int J Food Sci Technol* 2001; 36:703-725.

8. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 4:152-159.
9. Rauha, J.-P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kähkönen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 2000; 56:3-12.
10. Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G.-J. E.; Komaitis, M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *J Agric Food Chem* 2005; 53:1190-1195.
11. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *J Agric Food Chem* 1996; 44:701-705.
12. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *J Agric Food Chem* 1996; 44:3426-343.
13. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem* 1998; 46:4113-4117.
14. Daood, H. G.; Vinkler, M.; Markus, F.; Hebshi, E. A.; Biacs, P. A. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chem* 1996; 55:365-372.

15. Osuna-García, J. A.; Wall, M. M.; Waddell, C. A. Endogenous Levels of Tocopherols and Ascorbic Acid during Fruit Ripening of New Mexican-Type Chile (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. *J Agric Food Chem* 1998; 46:5093-5096.
16. Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G. Carotenoid Composition in the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Szentesi Kosszarvu during Ripening. *J Agric Food Chem* 1996; 44:711-716.
17. Levy, A.; Hare, S.; Palevitch, D.; Akiri, B.; Menagem, E.; Kanner, J. Carotenoid Pigments and p-Carotene in Paprika Fruits (*Capsicum* Spp.) with Different Genotypes. *J Agric Food Chem* 1995; 43:362-366.
18. Hornero-Méndez, D., Guevara, R.G.; Mínguez-Mosquera, M.I. Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars during Ripening. Cultivar Selection for Breeding. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3857-3864.
19. Kirschbaum-titze, P.; Hiepler, C.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M. Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of Capsaicinoid Content Following Cellular Disruption. *J Agric Food Chem* 2002; 50:1260-1263.
20. Kirschbaum-titze, P.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M. Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 2. Heterogeneity of Capsaicinoid Content in Individual Fruits from One Plant. *J Agric Food Chem* 2002; 50:1264-1266.
21. Rosa, A.; Deiana, M.; Casu, V.; Paccagnini, S.; Appendino, G.; Ballero, M.; Dessi, M.A. Antioxidant Activity of Capsinoids. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7396-7401.

22. Ochi, T.; Takaishi, Y.; Kogure, K.; Yamauti, I. Antioxidant Activity of a New Capsaicin Derivative from *Capsicum annuum*. *J Nat Prod* 2003; 66:1094-1096.
23. Howard, L. R.; Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Villalon, B. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. *J Agric Food Chem* 2000; 48:1713-1720.
24. Marín, A.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 2004; 52:3861-3869.
25. Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem* 2005; 53:1750-1756.
26. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu Reagent. *Meth Enzymol* 1999; 299:152–178.
27. Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Del castillo, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad Res Comms* 1992; 17:299-311.
28. Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., Del Castillo, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:153–158.

29. Desmarchelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Llesuy, S.; Ciccía, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *Int J Pharmacognosy* 1997; 35:288-296.
30. Draper, H.H., Hadley, M., Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Meth Enzymol* 1990; 186:421–431.
31. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265–275.
32. Oliveira, S.Q.; Trentin, V.H.; Kappel, V.K.; Barelli, C.; Gosmann, G.; Reginatto, F.H. Screening of Antibacterial Activity of South Brazilian *Baccharis* Species. *Pharm Biol* 2005; 43:434–438.
33. National Committee of Clinical Laboratory Standards. Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Fourteenth informational supplement. NCCLS document M100-514. NCCLS, Wayne, PA, 2004.
34. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727–747.
35. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J.; Paganga, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:933–956.

36. Deepa, N.; Kaur, C.; George, B.; Singh, B.; Kapoor, H.C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT* 2007; 40:121–129.
37. Shan, B.; Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and characterization of Their Phenolic Constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53:7749-7759.
38. Sun, J.; Chu, Y.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002; 50:7449-7454.
39. Kalt, W.; Forney, C.F.; Martin, A.; Prior, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J Agric Food Chem* 1999; 47:4638-4644.
40. Oboh, G.; Puntel, R.L.; Rocha, J.B.T. Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in brain – *in vitro*. *Food Chemistry* 2007; 102:178–185.
41. Fraga, C.G.; Tappel, A.L. Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem J* 1988; 252:893-896.
42. C. Desmarchelier, C.; Lisboa Romão, R., Coussio, J.; Ciccía, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:69–77.

43. Polydoro, M.; de Souza, K. C.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E.E.S.; Bassani, V.L.; Moreira, J.C.F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci* 2004; 74:2815–2826.
44. Molina-Torres, J.; García-Chávez, A.; Ramírez-Chávez, E. Antimicrobial properties of alkalamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64:241–248.
45. Iorizzi, M.; Lanzotti, V.; Ranalli, G.; De Marino, S.; Zollo, F. Antimicrobial Furostanol Saponins from the Seeds of *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. *J Agric Food Chem* 2002; 50:4310-4316.
46. Diz, M. S.S.; Carvalho, A.O.; Rodrigues, R.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Da Cunha, M.; Alves, E.W.; Okorokova-Façanha, A.L.; Oliveira, M.A.; Perales, J.; Machado, O.L.T.; Gomes, V.M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:1323–1332.



**Table 1.** Total phenolic content in different parts of *C. baccatum* fruits at different maturity stages.<sup>a</sup>

Maturity stage	Structure extract	Total phenolic
Immature	Pericarp	1920.0 ± 24.0 <sup>e</sup>
	Seed	5449.8 ± 261.6 <sup>c</sup>
	Placenta	7688.1 ± 89.4 <sup>a</sup>
Mature	Pericarp	1523.9 ± 64.9 <sup>f</sup>
	Seed	5847.2 ± 121.9 <sup>b</sup>
	Placenta	3511.4 ± 114.7 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Data are expressed as chlorogenic acid equivalents (CAE) in mg/100g of dry weight (DW) (Mean ± S.D. of n = 6)

Values with the same letters indicate no significant differences (p < 0.05)

**Table 2.** Antimicrobial activity of the extract of immature seeds of *C. baccatum* fruit (n=3).

Microorganism	Inhibition zone <sup>a</sup>						
	Immature seed extract			Antibiotics <sup>d</sup>			
	Doses (ug)			AP	CP	CZ	FC
	2000	1000	200				
<i>Staphylococcus aureus</i>	na	na <sup>b</sup>	na	28	nt <sup>c</sup>	nt	nt
<i>Escherichia coli</i>	na	na	na	nt	25	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	na	na	na	nt	nt	25	nt
<i>Enterococcus faecalis</i>	na	na	na	28	nt	nt	nt
<i>Enterococcus faecium</i>	na	na	na	29	nt	nt	nt
<i>Candida glabrata</i>	13	na	na	nt	nt	nt	30
<i>Candida albicans</i>	10	na	na	nt	nt	nt	28
<i>Candida krusei</i>	10	na	na	nt	nt	nt	30
<i>Candida dubliniensis</i>	na	na	na	nt	nt	nt	29
<i>Candida parapsilosis</i>	12	11	na	nt	nt	nt	33
<i>Cryptococcus neoforms</i>	12	na	na	nt	nt	nt	30
<i>Candida albicans</i> <sup>e</sup>	10	na	na	nt	nt	nt	30
<i>Candida parapsilosis</i> <sup>e</sup>	10	na	na	nt	nt	nt	29

<sup>a</sup> Diameter of Zone of inhibition (mm) including disk diameter of 6 mm

<sup>b</sup>na, not active

<sup>c</sup>nt, not tested

<sup>d</sup>AP, ampicillin; CP, chloramphenicol; CZ, Ceftazidn; FC, Fluconazole

<sup>e</sup>clinic-isolated

## Figure legends

**FIG. 1.** HPLC profiles (280 nm) of extracts from parts of *C. baccatum* fruits. **1**-chlorogenic acid; **2**-caffeic acid; **3**-rutin

**FIG. 2.** TRAP profile of immature parts (**A**) and mature parts (**B**) of *C. baccatum* fruits. Chemiluminescence intensity (percentage of counts per minute-CPM) measured after addition of 10  $\mu$ l of Trolox (final concentration 200 nM) and the extracts (final concentration 2.5  $\mu$ g/ml) to 4 ml of glycine buffer (0.1 M), pH 8.6, containing luminol (4 mM) and AAPH (10 mM) at 21 °C. Values are means  $\pm$  S.D. of n=6.

**FIG. 3.** TAR index (Io/I) of parts of *C. baccatum* fruits during different maturity stage. Data are mean  $\pm$  S.D. of n = 6. The values with the same letters indicate no significant differences by Tukey's test (p<0.05).

**FIG. 4.** Correlation between total phenolic content (CAE) and TAR index (Io/I) of extracts from parts of *C. baccatum* fruits (r=0.863 p<0.05).

**FIG. 5.** Effect of immature placenta and mature seed extracts (final concentration 2.5  $\mu$ g/ml) on TBARS levels. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. of triplicates from two independent experiments. Values with the same letters indicate no significant differences by Tukey's test (p<0.05).

FIG. 1

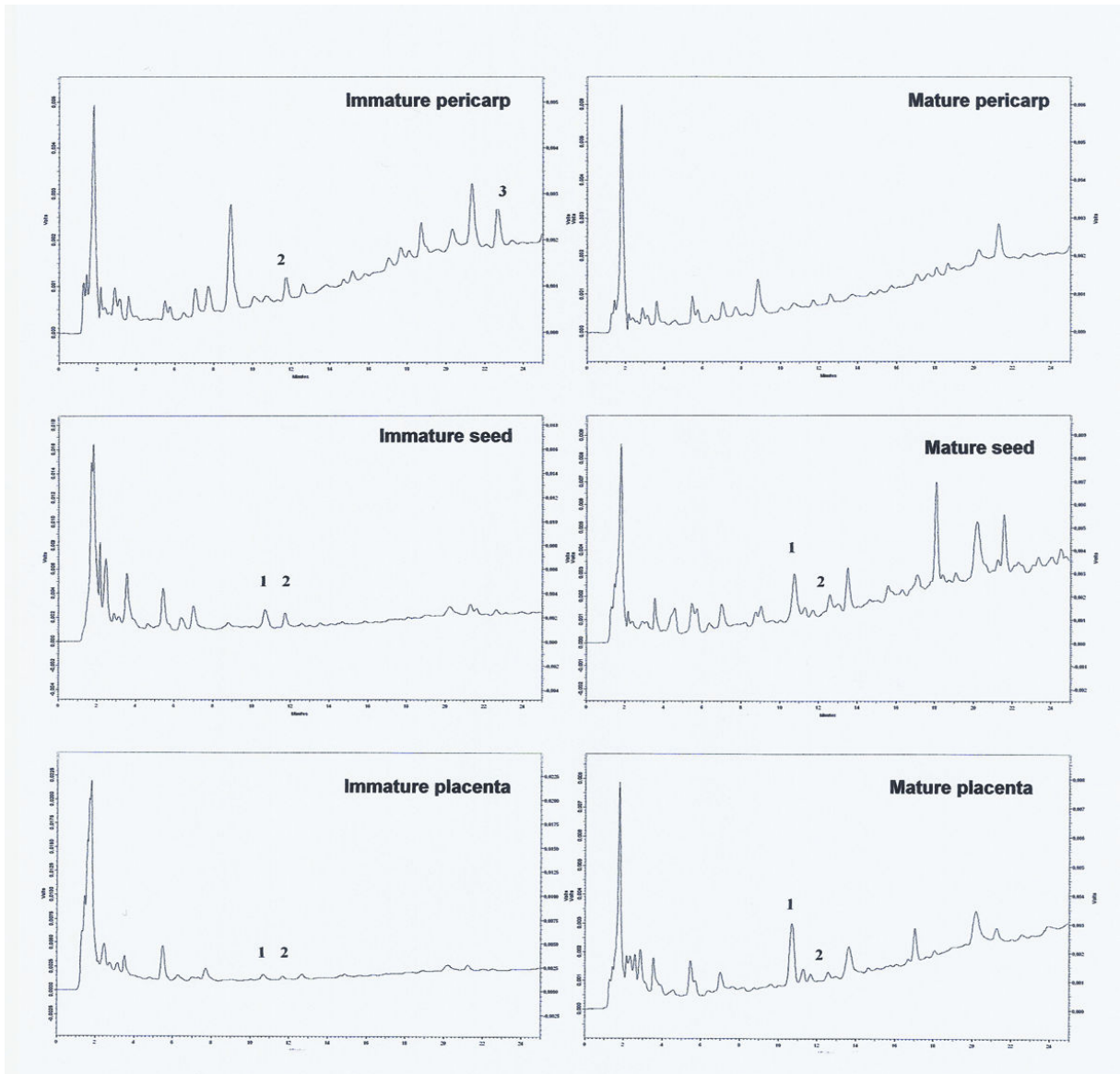


FIG. 2

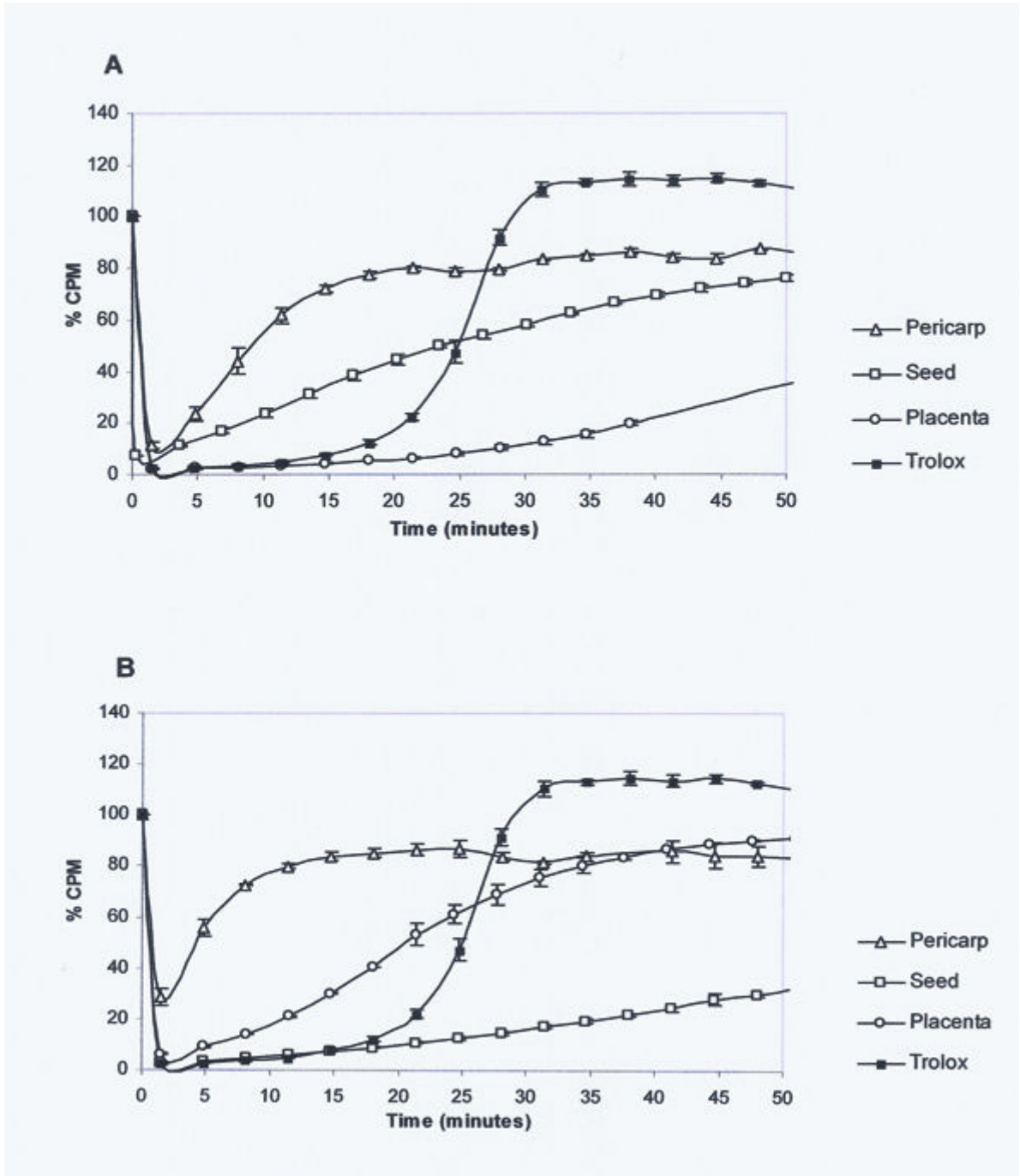


FIG. 3

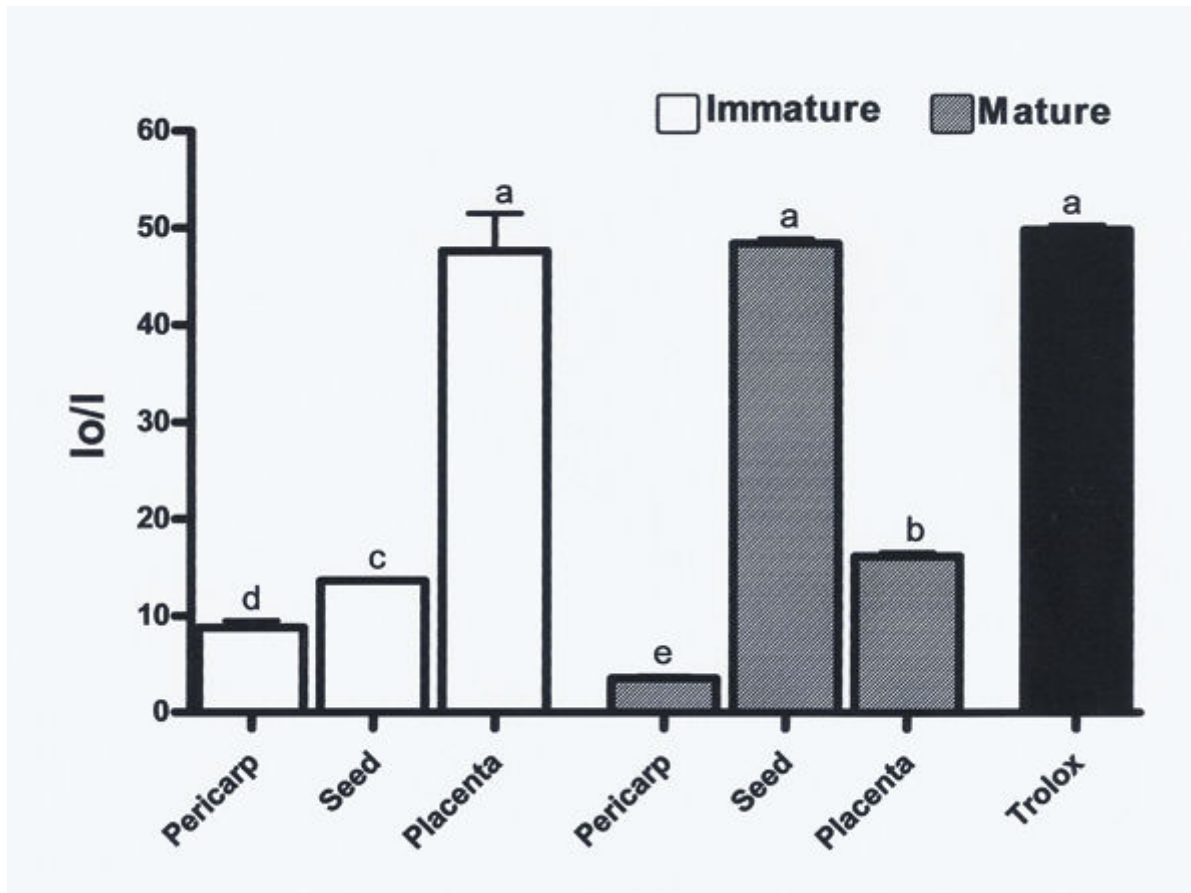


FIG. 4

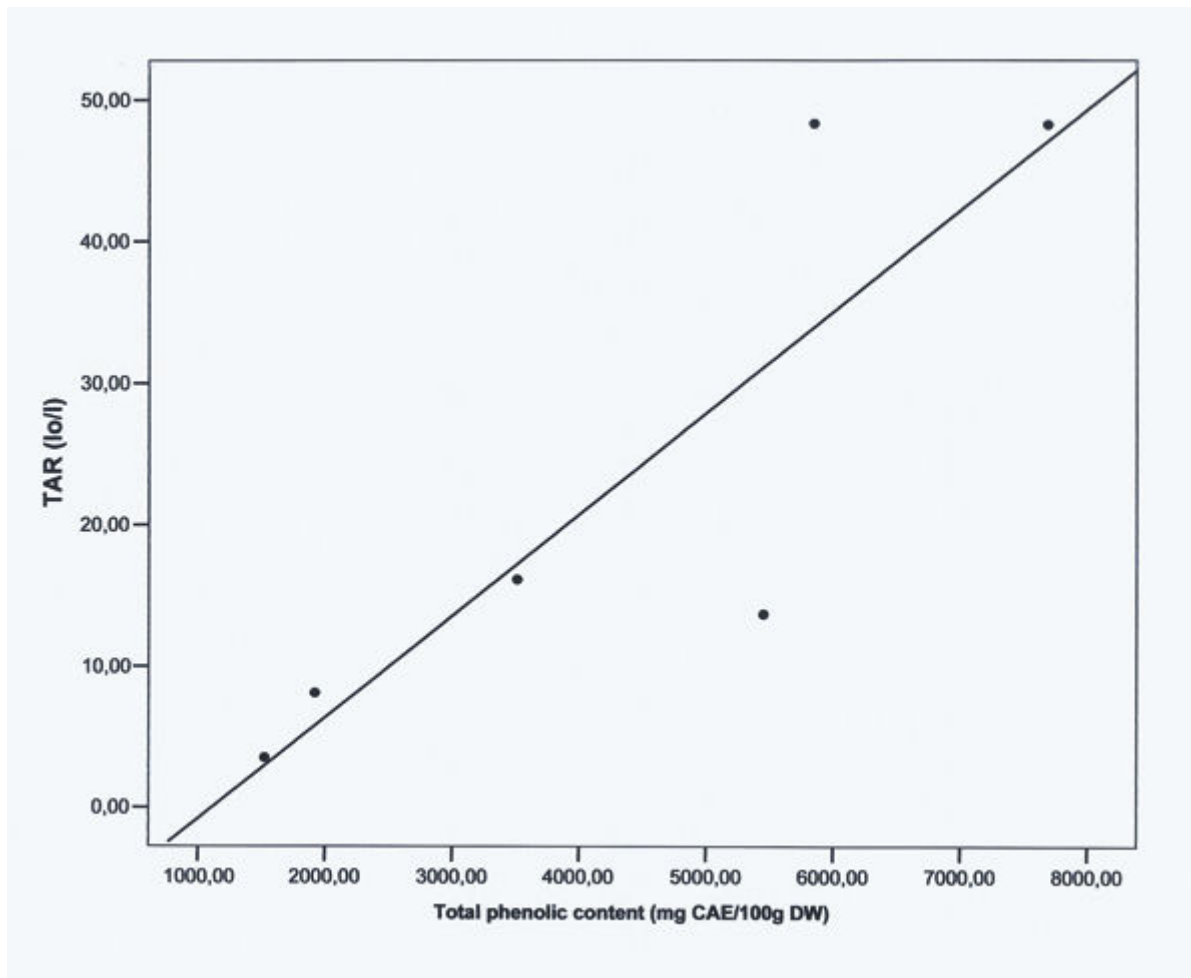
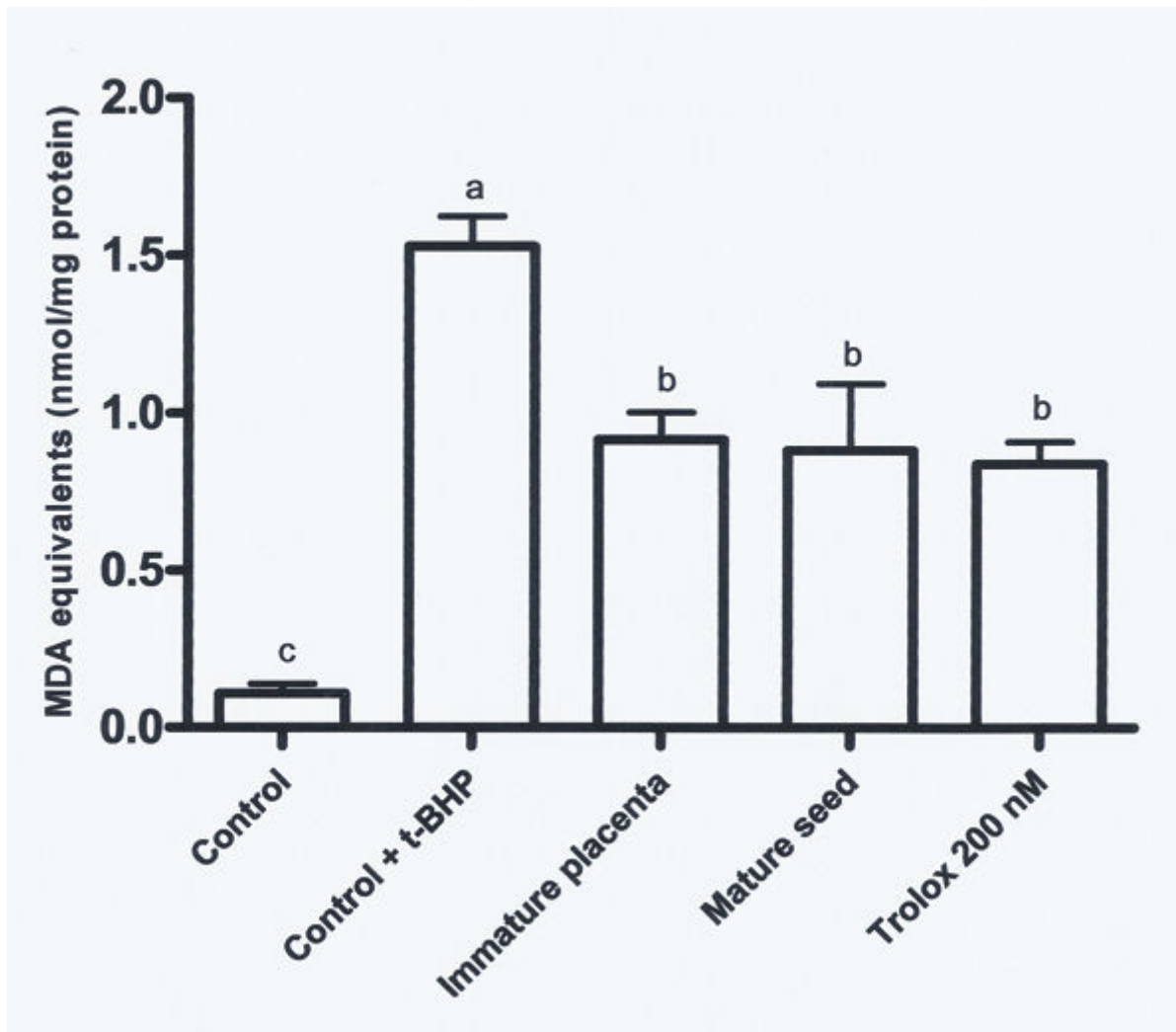


FIG. 5





## 4. DISCUSSÃO GERAL

### 4.1 Atividade antioxidante e compostos fenólicos

Estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo de frutas e vegetais ricos em polifenóis tem sido cada vez mais associado à redução de risco doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo (CHU et al., 2002; SUN et al., 2002).

Tal achado está relacionado provavelmente com os compostos antioxidantes presentes nestes alimentos, como por exemplo, compostos fenólicos, os quais são considerados de grande importância nutricional, porque são capazes de inibir a ação de radicais livres, prevenindo seus efeitos deletérios (RACCHI et al., 2002).

As espécies de *Capsicum* são amplamente utilizadas mundialmente e apresentam em sua composição química teores significativos de composto fenólicos que contribuem para as qualidades sensoriais dos frutos: cor, adstringência, amargor e sabor e cujos níveis variam fortemente durante o processo de crescimento e de maturação e, conseqüentemente, essas variações influenciam as atividades biológicas (CONFORTI et al., 2007).

Portanto, no presente estudo o conteúdo total de fenólicos dos extratos das partes (pericarpo, placentas, sementes) dos frutos imaturos e maduros de *C. baccatum* L. var. *pendulum* foi determinado. Os resultados encontrados demonstram que todos os extratos analisados apresentam níveis significativos de compostos fenólicos, que variaram de 1523,9 a 7688,1 mg de EAC/100g.

Uma clara diferença foi observada no conteúdo de fenólicos entre os diferentes estádios de maturação, sendo que nos frutos imaturos o maior teor foi observado no extrato da placenta (7688,1 mg de EAC/100g) e nos frutos maduros no extrato das

sementes (5847,2 mg de EAC/100g), confirmando o resultado de vários estudos que encontraram mudanças na composição química influenciada pelo processo de maturação (CONFORTI et al., 2007, DEEPA et al., 2007; HOWARD et al., 2000; MARIN et al., 2004).

Os dados verificados nas análises de CLAE confirmam a presença de alguns compostos fenólicos (rutina, ácido caféico e clorogênico) na maioria dos extratos testados. Entretanto, nos frutos da espécie analisada não foi verificada a presença de capsaicina, indicando a suave pungência como característica.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade sequestradora de radicais livres de extratos como uma medida da atividade antioxidante *in vitro*. Estes métodos são geralmente baseados na inibição da acumulação de produtos oxidados porque a geração de radicais livres é bloqueada pela adição de antioxidantes, que capta os radicais livres e leva a uma redução desses compostos (CHOI et al., 2002).

Para verificar a capacidade de captação de radicais livres *in vitro* dos extratos de *C. baccatum* foi utilizado o método do TRAP e TAR. Na presença de moléculas antioxidantes há uma diminuição da quimiluminescência (QL) induzida pelo luminol e a fonte de radical livre, AAPH, sendo que esta inibição da QL é proporcional à capacidade antioxidante do extrato (LISSI et al., 1995). No presente trabalho, a capacidade antioxidante dos extratos foi comparada com um antioxidante de referência, Trolox e os resultados indicam que todos extratos analisados apresentam propriedade antioxidante *in vitro*.

Uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante *in vitro* e o conteúdo de fenólicos dos extratos das partes dos frutos de *C. baccatum* foi verificada. Esta correlação demonstrada foi semelhante à encontrada para outros extratos ricos em polifenóis, sugerindo que os compostos fenólicos poderiam ser os responsáveis pela

atividade antioxidante destes extratos (BANERJEE e DASGUPTA, 2005; SHAN et al., 2005; ZAINOL et al., 2003). No entanto, cabe ressaltar que por ser um extrato bruto as propriedades encontradas podem ser devido ao sinergismo dos diversos fitoquímicos presentes nos extratos.

O método utilizado neste estudo para avaliação da proteção dos extratos a lipoperoxidação no modelo *ex vivo* foi o ensaio do TBARS, o qual é utilizado para avaliar a inibição da peroxidação lipídica provocada por um pró-oxidante, *t*-BOOH, que causa dano oxidativo em fatias de fígado de rato. Este método apesar de ter algumas limitações como a baixa especificidade, é comumente usado para detectar a peroxidação lipídica em extrato de tecidos de animais, servindo para mensurar substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e conjugação de dienos (CHEN e TAPPEL, 1996; MEAGHER e FITZGERALD, 2000).

A avaliação da inibição a peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS *ex vivo* mostrou que os extratos testados, placenta imatura e semente madura, protegeram as fatias de fígado de rato da peroxidação lipídica induzida pelo *t*-BOOH, sendo que esta proteção foi semelhante ao Trolox. Corroborando com nossos resultados Oboh et al. (2007) demonstraram um efeito inibitório na lipoperoxidação das espécies *C. annum* e *C. chinese*. Outros estudos prévios descrevem que os polifénóis conferem proteção contra dano oxidativo de lipídeos (DZIEDZIC e HUDSON, 1984; POLYDORO et al., 2004).

#### **4.2 Atividade antimicrobiana**

Todas as cepas de *Candida* spp testadas, com exceção da *Candida dubliniensis*, e o *Cryptococcus neoforms* se mostraram sensíveis ao extrato hidroalcoólico da semente imatura, sendo que os halos de inibição obtidos variaram de 10 a 12 mm de diâmetro. Quando comparado aos halos de inibição frente aos antibióticos, nota-se que eles variaram

de 28 a 33 mm. Assim sendo, o efeito antifúngico observado deste extrato foi fraco quando comparado aos antibióticos padrões testados, porém por se tratar de um extrato vegetal seu poder antimicrobiano pode ser considerado de interesse científico, indicando potencial para continuidade da pesquisa.

Cruz et al. (2003) descreve que a intensidade da atividade antibacteriana das espécies de *Capsicum* spp está diretamente relacionada com sua pungência e com concentração de capsaicinóides, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho, no qual a pimenta ‘cambuci’ (*C. baccatum* var. *pendulum*) apresenta característica doce, sendo que não foi detectado capsaicinóides em seu perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e não apresentou atividade antibacteriana. Corroborando com estes resultados Carvalho et al. (2005) não encontrou atividade antibacteriana para a pimenta ‘cambuci’, somente para outras pimentas com maior pungência, como as pimentas dedo-de-moça e malagueta.

Por outro lado, Cichewicz e Thorpe (1996) analisou a atividade antibacteriana do extrato de *C. baccatum* frente a diversas bactérias como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, e *Streptococcus pyogenes*, e obteve resultados satisfatórios. Essa diferença nos resultados pode ser devido a técnicas diferentes de análise e extração.

Alguns estudos estão isolando compostos das sementes de *C. annuum* L, tais como saponinas e peptídeos, com características antifúngicas (DIZ et al., 2006; IORIZZI et al. 2002). Estes resultados estariam de acordo com os achados do presente trabalho, visto que somente o extrato da semente imatura de *C. baccatum* apresentou atividade antifúngica e não possui presença detectável de capsaicinóides, esta atividade poderia estar relacionada com outros compostos presentes no extrato.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho com os ensaios de atividade antioxidante permitem as seguintes conclusões:

- Os extratos hidroalcoólicos das diferentes partes do fruto de *C. baccatum* L. var. *pendulum* apresentaram atividade antioxidante *in vitro*;
- Os extratos da placenta imatura e semente madura dos frutos de *C. baccatum* revelaram um efeito protetor na peroxidação lípidica em homogenato de fatias de fígado de ratos no modelo *ex vivo*;
- Os fenólicos presentes no extrato podem ser os compostos responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos;
- Uma modificação da composição química na diferentes partes dos frutos de *C. baccatum* foi observada influenciada pela maturação do fruto.

Com os ensaios da atividade antimicrobiana as conclusões são as seguintes:

- Os extratos não apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas;
- Somente o extrato de semente imatura apresentou uma fraca atividade antifúngica, contra as cepas padrão *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoforms* e isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

## 6. PERSPECTIVAS

- Repetir este estudo com extratos obtidos de frutos colhidos em outros anos, a fim de verificar a diferença entre a época de obtenção do material vegetal e também se os resultados do ano de 2006 se reproduzem, visto que as variações climáticas são consideráveis;
- Realizar um teste *in vivo*, visando confirmar os resultados obtidos *in vitro* e *ex vivo*;
- Fracionar o extrato e realizar testes bioquímicos, objetivando identificar o composto e/ou grupo de compostos responsáveis pelas atividades biológicas observadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.

BOSLAND, P. W.; BAILEY, A. L.; IGLESIAS-OLIVAS, J. **Capsicum Pepper Varieties and Classification**. Circular 530. Cooperative Extension Service. College of Agriculture and Home Economics; New Mexico State University. Las Cruces: New Mexico, USA, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.

CARVALHO, J.C.T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 1999.

CARVALHO, H.H.C., CRUZ, F.T., WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI; L.B. **Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): Botânica**. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>>. Acesso em: 06 de outubro de 2007.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidations induced by CBrCl<sub>3</sub> in liver, lung, heart, and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 854-858, 1996.

CHOI, C. W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CHOWDHURY, B.; MUKHOPADHYAY, S.; BHATTACHARAYAY, D.; DE, A.K. Capsaicin, a unique antioxidant, anti-inflammatory, analgesic compound with antifungal activity against dermatophytes. **Medical Science Research**, v.24, p. 669-670, 1996.

CHU, Y.; SUN, J. ; WU, X. ; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6910-6916, 2002.



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

CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. **Food Chemistry**, v. 102, p.1096–1104, 2007.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COWAN, M.M. Plant Products as antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

CRUZ, F.T., CARVALHO, H.H.C., WIEST, J.M. Avaliação da atividade antibacteriana de pimentas (*Capsicum* sp.) e sua relação com o teor de capsaicinóides. In: Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 15. **Resumos**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. v.1, p.503.

DAVIS, C.B.; MARKEY, C.; BUSCH, M.A.; BUSCH, K.W. Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007 (*in press*).

DEEPA, N.; KAUR, C.; GEORGE, B.; SINGH, B.; KAPOOR, H.C. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT**, v.40, p.121–129, 2007.

DELI, J; MOLNAR,P.; MATUS, Z.; TOTH, G. Carotenoid Composition in the Fruits of Red Paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during Ripening;Biosynthesis of Carotenoids in Red Paprika. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1517-1523, 2001.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo Interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

DIZ, M. S.S.; CARVALHO, A.O.; RODRIGUES, R.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; DA CUNHA, M.; ALVES, E.W.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; OLIVEIRA, M.A.; PERALES, J.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p.1323–1332, 2006.

DZIEDZIC, S.Z; HUDSON, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v.14, p.45-51, 1984.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Capsicum: pimentas e pimentões do Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/especies.htm>>. Acesso em: 6 de outubro de 2007.

ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Membrane lipid peroxidation: cellular mechanisms and toxicological implications. In: C. A. Tyson e J. M. Frazier. **Methods in Toxicology**. **Academic Press**: 1994, p. 33-45.

ESHBAUGH, W.H.. **Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery**. p. 132-139. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York, 1993.

FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B.; RIBEIRO, S.M; HONDA, N.K.; PEREIRA, E.C. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.1, p.43-49, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

GRYGLEWSKI, R. J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SUEIS, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoid. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 317, 1987.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. **Nature Publishing Group**, 2001. p. 1-7.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n.7, p.1141-1148, 1983.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts. Based on FE(III)Xylenol orange complex formation, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HERTOG, M.G; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA,R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and câncer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v.155, n.4, p. 381-386, 1995.

HOWARD, L. R.; TALCOTT, S. T.; BRENES, C. H.; VILLALON, B. Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1713-1720, 2000.

IORIZZI, M.; LANZOTTI,V.; RANALLI, G.; DE MARINO, S.; ZOLLO, F. Antimicrobial Furostanol Saponins from the Seeds of *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4310-4316, 2002.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, p.153–158, 1995.

MACHADO,A.; BARROS,E. Princípios básicos do uso dos antimicrobianos. In: BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: consulta rápida**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2001.

MARÍN, A.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.3861-3869, 2004.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1750-1756, 2005.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAMI, C. Effect of flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n.6, p. 1167-1179, 1992.

MIEAN, K.H.; MOHAMED, S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3106-3112, 2001.

MIRANDA, E.T. ; SILVA, R.A.M. ; FUSCO-ALMEIDA, A.M. ; MELHEM, M.S.C. ; PUKINSKAS, S.R.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Epidemiologia de candidíase hospitalar : importância da identificação específica. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.24, n.1, p.39-45, 2003.

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

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. v.2.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C.; ANDRADES, M. E.; SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of achyrocline satureioides extracts. *Life Sci* 2004; 74:2815–2826.

RACCHI, M.; DAGLIA, M.; LANNI, C.; PAPETTI, A.; GOVONI, S.; GAZZANI, G. Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.1272-1277, 2002.

RAUHA, J.-P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.3-12, 2000.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C. **Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): Introdução e importância econômica.** Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm>>. Acesso em: 06 de outubro de 2007.

RIBEIRO, C.S.C. **Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): cultivares.** Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/cultivares.htm>>. Acesso em: 06 de outubro de 2007.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933–956, 1996.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 4, p.152-159, 1997.

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

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p.287–306, 2005.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and characterization of Their Phenolic Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.7749-7759, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-81, 2002.



SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

SURH, Y. J. More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. **Journal of the National Cancer Institute**, v.94, p.1263-1265, 2002.

THAMPI, P. S. S. A glimpse of the world trade in *Capsicum*. In: KRISHNA, A. **Capsicum: The genus Capsicum**. 1<sup>a</sup> ed. CRC Press, New york, v. 33, 2003

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

VILELA, N. J. **Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): Coeficientes técnicos, custos, rendimentos e rentabilidade**. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/coeficientes.htm>>. Acesso em 06 de outubro de 2007.

ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, S.; LOPEZ, S.; GATTUSO, S.; MUNOZ, J.; CRUANES, A.; VIVOT, E.; CRUANES, M.; SALINAS, A.; RUIZ, R.; RUIZ, S. *In vitro* antifungal evaluation and studies on the mode of action of eight selected from argentine flora. **Phytomedicine**, v.5, p.389-395, 1998.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZAINOL, M.K.; HAMID, A.; YUSOF,S.; MUSE, R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Food Chemistry**, v. 81, p.575-581, 2003.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 1999.