



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)**

**CARINA LEMOS MONTEIRO CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE  
CAROTENOIDES DE PIMENTA (*Capsicum Chinense*)**

**BELÉM- PA  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)**

**CARINA LEMOS MONTEIRO CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE  
CAROTENOIDES DE PIMENTA (*Capsicum Chinense*)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues.**

**BELÉM- PA  
2014**

**CARINA LEMOS MONTEIRO CARVALHO**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE  
CAROTENOIDES DE PIMENTA (*Capsicum Chinense*)**

Data de Avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_ Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues  
(FEA/ITEC/UFPA - Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geormenny Rocha dos Santos  
(FEQ/ITEC/UFPA - Membro interno)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Cardoso de Aquino  
(DETAL/UFC- CE - Membro externo)

---

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto  
(Embrapa Agroindústria Tropical/CE - Membro externo)

"Procurando, buscando, investigando...  
... você está em sério perigo!  
A qualquer momento pode estar amando, rindo, curtindo...  
- Você pode acidentalmente encontrar Deus."  
Osho

## **Agradecimentos**

A Deus, essa força maior sem a qual não posso seguir em frente;

Às minhas estrelas, mamãe e vovó, por sempre iluminarem meus caminhos, de onde quer que estejam;

Ao meu tio José e às minhas tias queridas Irene, Ivanilde, pelo incentivo a melhorar todos os dias e, principalmente, Iraci, por me motivar a não desistir das minhas metas ainda que parecessem difíceis;

À Tia Isola por me adotar e sempre estar ao meu lado, me apoiando em qualquer sentido;

Aos meus irmãos, Chiara, Tarcísio e Jivago, pelas vivências inesquecíveis tão essenciais nos momentos de "respiração";

Ao meu irmão Inácio, pelo incentivo à busca pelo conhecimento diferente do comum, pelas noites de estudo de artigos científicos, misturando ciência e desabafos;

À minha irmã querida Camila, por toda dedicação e apoio, principalmente na última fase da pesquisa, pelo abrigo e por tudo mais;

Aos meus sobrinhos Guilherme, Miguel e Milenka, pelos momentos de felicidade, diversão e união, cruciais para volta à rotina;

Às minhas cunhadas Nicolý, Suélen e Andréa, pela companhia em tantos momentos bons;

Ao meu namorado, Pauleandro, pela compreensão nos momentos mais difíceis do trabalho e por não desistir de nós, mesmo com a distância;

Aos colegas do LAMEFI (Danilo, Márlia, Paula, Rutelene, Paulo, Natália, Carolina, Kharen, Cintieley, Danielly Evelyn, Jézica, Webert, Dayala, Yasmin, Patrícia, Márcio), pela parceria nos dias de trabalho, principalmente aos que ajudaram nos dias de processamento da pimenta. Especialmente aos queridos Aline, Rebeca, Lauana, Rafaella, Homero, Danielle, Robson e Wasley, pelas boas horas fora do laboratório;

Às queridas amigas e colegas de quarto, Cleidiane e Natácia, pela prazerosa convivência do acordar à hora de dormir, pelos meses que moramos juntas e sempre nos ajudamos mutuamente;

Aos amigos do Bioprocessos, Cívita, Helder, Rakel, Caroline, Genilton, Leise e Cynthia pela convivência e parceria e, principalmente, às Janaina, Virna, Adriana e Natália Lima, por me mostrarem como trabalhar dando o melhor de mim;

À Natália Moura, pela prontidão em ajudar-me sempre que precisei; À Nara, por me acompanhar nos serões de preparo de extrato;

À Tigressa, pela ajuda nas análises cromatográficas, pela paciência e dedicação;

Aos professores Antonio e Luiza, por me aceitarem no PPGCTA mesmo desconhecendo minha personalidade e capacidade e, principalmente, por permitirem o enriquecimento do meu trabalho, terminando-o na Embrapa/ Fortaleza;

Ao Gustavo, por me ensinar como fazer ciência sem perder a Humanidade;

À Andréa, por acompanhar meu trabalho diariamente na fase final, pelo apoio e psicanálise, pelos ensinamentos para dissertação e para vida, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por tudo;

À UFPA por possibilitar a continuidade da minha formação acadêmica;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

À Novozymes Latim América, pelo fornecimento das preparações enzimática;

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo privilégio de utilizar suas dependências e equipamentos durante a fase final da minha pesquisa.

Obrigada!

## Resumo

A espécie *C. chinense*, conhecida na região Norte (principalmente no estado do Pará) como pimenta de cheiro, é geralmente consumida verde, sendo considerada "passada" e descartada quando madura. Extrair carotenoides (CT) dessa espécie é de interesse para indústria de alimentos, pois possibilita a exploração de novas fontes desses biocompostos funcionais e reduz a quantidade de subprodutos descartados nas feiras, áreas de venda e de processamento dessa matéria-prima. Os objetivos foram: obter uma polpa de pimenta que favoreça o processo de extração dos carotenoides; caracterizar quanto à composição centesimal a polpa de pimenta; caracterizar as preparações enzimáticas comerciais quanto à atividade enzimática; estudar o método de extração via solvente variando tipo de solvente e tempo de incubação; estudar o método de extração via maceração enzimática, variando tipo de enzima, temperatura, tempo de incubação e concentração enzimática; estudar o método de extração via ultrassom variando o tipo e a concentração de solvente e identificar o perfil de carotenoides nos extratos de pimenta pelo método de CLAE. Utilizando o método convencional (em Soxhlet) estudaram-se Hexano e Etanol nos tempos de 2, 4 e 6h. No método não convencional por ultrassom estudaram-se Hexano e Etanol nas combinações de 0- 50mL (do puro ao misturado). No método não convencional de extração por maceração enzimática, estudou-se, em escala de bancada, um planejamento fracionário  $2^{4-1}$  comparando duas preparações enzimáticas comerciais (Viscozyme L e Celluclast 1,5L). Fez-se ainda um estudo preliminar, em bioreator de bancada (5L). Para identificação, realizou-se CLAE nas amostras *in natura* verde e nos extratos obtidos pelos diferentes métodos. Os melhores teores de CT encontrados foram 13,53µg/g de β- caroteno (Soxhlet utilizando Hexano); 12,4 µg/g de β- caroteno (Ultrassom ensaio 7- 30mL de Hexano e 20mL de Etanol); 5,2 µg/g de β- caroteno (ME em escala de bancada); 6,4 µg/g de β- caroteno (Celluclast/1h/200ppm); 28,44 µg/g de β- caroteno (ME em escala piloto). Por outro lado, no método de CLAE, o extrato com maior teor (em µg/g de β- caroteno) foi o de pimenta *in natura* verde, seguido do extrato *in natura* madura e do extrato obtido em soxhlet utilizando hexano. No presente trabalho pode-se concluir que, estudando diversos métodos e variáveis, é possível obter carotenoides de pimenta de cheiro madura, antes subproduto considerado descarte.

**Palavras- chave:** carotenoides, extração, solventes, maceração enzimática, ultrassom e cromatografia.

## Abstract

The specie *C. chinense*, known in the North of Brazil (mainly in the state of Pará) as “pimenta de cheiro”(smell pepper) is generally consumed green, and is considered "passed" and discarded when mature. To extract carotenoids (CT) of this specie is of interest to the food industry because it enables the exploration of new sources of these functional biocompounds and reduces the amount of by-products discarded at fairs, sales areas and processing of this raw material. The objectives were to obtain a pepper pulp that favors the extraction process of carotenoids; characterize as to composition pepper pulp; characterize enzymatic commercial of preparations for enzymatic activity; study the extraction method via solvent ranging type of solvent and incubation time; study the extraction method via enzymatic maceration, ranging type of enzyme, temperature, incubation time and enzyme concentration. Studying the extraction method via ultrasound varying the type and concentration of solvent and identify the carotenoid profile in pepper extracts by HPLC method. Using the conventional method (with hexane) were studied Hexane and ethanol at 2, 4 and 6 hours. With the unconventional method and ultrasound were studied Hexane and ethanol in combinations of 0- 50 mL (pure to mixed). Using enzymatic maceration, an unconventional method of extraction, we studied, bench scale, a fractional planning  $2^{4-1}$  comparing two commercial enzyme preparations (Viscozyme L and 1.5 L Celluclast). There was even a preliminary study in bioreactor bench (5L). To identification, CLAE were made on fresh green samples and on extracts obtained by different methods. The best CT contents found were 13,53 $\mu$ g / g  $\beta$ - carotene (Soxhlet using Hexane); 12.4 mg / g of  $\beta$ - carotene (7- Ultrasound Test 20ml of hexane and 30ml ethanol); 5.2 g / g of  $\beta$ - carotene (ME bench scale); 6.4 mg / g of  $\beta$ - carotene (Celluclast / 1h / 200 ppm); 28.44 mg / g of  $\beta$ - carotene (ME pilot scale). On the other hand, the HPLC method, the extract with a higher content (in mg / g of  $\beta$ -carotene) is the fresh green pepper, followed extract fresh and mature extract obtained using hexane in soxhlet. In this study it can be concluded that, studying various methods and variables, you can extract carotenoids from mature smell pepper before by product considered disposal.

**Key words:** *C. chinense*, pimenta de cheiro (smell pepper), carotenoids, extraction, solvents, enzymatic maceration, ultrasound and chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

| FIGURA                                                                                                                   | Pág |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Pimenta <i>C. chinense</i> em diversos estágios de maturação.                                                  | 20  |
| Figura 2: Fórmula Química dos Principais Carotenoides de Pimenta.                                                        | 23  |
| Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção da polpa de pimenta ( <i>Capsicum chinense</i> ) madura.                    | 29  |
| Figura 4: Curva de calibração do Radical Trolox para pimenta madura.                                                     | 31  |
| Figura 5: Curva de calibração do Radical Trolox para pimenta madura.                                                     | 32  |
| Figura 6: Curva de calibração do Padrão Puro de $\beta$ -caroteno.                                                       | 33  |
| Figura 7: Curva de calibração do Padrão Sintético de $\beta$ -caroteno.                                                  | 34  |
| Figura 8: Curva de calibração do Padrão de Zeaxantina.                                                                   | 34  |
| Figura 9: Fluxograma do processo de extração de carotenoides via solvente em Soxhlet.                                    | 36  |
| Figura10: Fluxograma do processo de extração de carotenoides por Ultrassom.                                              | 38  |
| Figura 11: Ultrassom de ponteira.                                                                                        | 38  |
| Figura 12: Fluxograma do processo de extração por maceração enzimática.                                                  | 40  |
| Figura 13: Bioreator- Extração por maceração enzimática em escala piloto.                                                | 42  |
| Figura 14: Comportamento reacional do Radical Trolox com extrato de Pimenta Madura.                                      | 46  |
| Figura 15: Comportamento reacional do Radical Trolox com extrato de Pimenta Verde.                                       | 47  |
| Figura 16: Extração via Solventes utilizando Etanol.                                                                     | 49  |
| Figura 17: Extração via Solventes utilizando Hexano.                                                                     | 49  |
| Figura 18: Diagrama de Pareto da extração de carotenoides por maceração enzimática. A) Zeaxantina; B) $\beta$ -caroteno. | 56  |
| Figura 19: Extração por ME. A- Tratamento com Viscozyme L; B- Tratamento com Celluclast 1,5L.                            | 59  |



|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 20: Extração por Maceração enzimática em escala piloto.                       | 60 |
| Figura 21: Cromatograma do padrão de $\beta$ -caroteno.                              | 63 |
| Figura 22: Cromatograma da amostra de pimenta in natura madura (diluição 1: 2).      | 63 |
| Figura 23: Cromatograma da amostra de pimenta in natura verde.                       | 64 |
| Figura 24: Cromatograma do extrato obtido em Soxhlet com Etanol.                     | 64 |
| Figura 25: Cromatograma do extrato obtido em Soxhlet com Hexano.                     | 65 |
| Figura 26: Cromatograma do extrato obtido em Ultrassom (ensaio 7).                   | 65 |
| Figura 27: Cromatograma do Extrato de ME em escala de bancada.                       | 66 |
| Figura 28: Cromatograma do extrato obtido por Maceração Enzimática em escala piloto. | 66 |
| Figura 29: Cromatograma de <i>Capsicum chinense</i> (FILHO, 2010).                   | 67 |
| Figura 30: Extratos para CLAE.                                                       | 67 |

## LISTA DE TABELAS

| TABELA                                                                                                                                                  | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabela 1: Composição centesimal pimenta <i>Capsicum chinense</i> .                                                                                      | 21   |
| Tabela 2: Combinação de solventes utilizados no método de extração por ultrassom.                                                                       | 37   |
| Tabela 3: Planejamento Fracionário 2 <sup>4-1</sup> .                                                                                                   | 41   |
| Tabela 4: Composição centesimal da pimenta de cheiro ( <i>Capsicum chinense</i> ) in natura madura, liofilizada madura e in natura verde em base úmida. | 44   |
| Tabela 5: Valores de carotenoides extraídos por Solventes da amostra de pimenta de cheiro in natura madura, expressos em µg/g de Zeaxantina.            | 50   |
| Tabela 6: Valores de carotenoides extraídos por Solventes da amostra de pimenta de cheiro in natura madura, expressos em µg/g de β-caroteno.            | 50   |
| Tabela 7: Valores de carotenoides extraídos por Ultrassom, expresso em µg/g Zeaxantina.                                                                 | 52   |
| Tabela 8: Valores de carotenoides extraídos por Ultrassom, expresso em µg/g β-caroteno.                                                                 | 53   |
| Tabela 9: Caracterização das atividades enzimáticas das preparações enzimáticas comerciais <sup>1</sup> .                                               | 54   |
| Tabela 10: Valores de CT extraídos por maceração enzimática, expressos em µg/g de Zeaxantina.                                                           | 55   |
| Tabela 11: Valores de CT extraídos por maceração enzimática com Celluclast 1,5 L, expressos em µg/g de β-caroteno.                                      | 55   |
| Tabela 12: Valores de carotenoides extraídos por Maceração Enzimática com Viscozyme L e Celluclast 1,5 L, expressos em µg/g de β-caroteno.              | 58   |
| Tabela 13: Resultados obtidos na CLAE.                                                                                                                  | 61   |
| Tabela 14: Picos encontrados na CLAE (TR-min).                                                                                                          | 62   |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 15: Carotenoides e seus respectivos TR (min)*.                              | 62 |
| Tabela 16: Picos de <i>Capsicum chinense</i> identificados por LCMS (FILHO, 2010). | 67 |

## LISTA DE SIGLAS

| SIGLA                                               | Pág. |
|-----------------------------------------------------|------|
| CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... | 26   |
| EAU- Extração Assistida por Ultrassom.....          | 27   |
| EAE- Extração Assistida por Enzimas.....            | 28   |
| CT- Carotenoides Totais.....                        | 35   |
| AIR- Resíduos insolúveis em álcool.....             | 41   |
| MTBE- Éter terc- Metil Butila.....                  | 42   |
| MeOH- Álcool Metílico.....                          | 42   |
| AAT- Atividade Antioxidante.....                    | 46   |
| ME- Maceração Enzimática.....                       | 59   |
| TR- Tempo de Retenção.....                          | 62   |

## SUMARIO

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                               | <b>15</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                | <b>18</b> |
| 2.1 GERAL.....                                                         | 18        |
| 2.2 ESPECÍFICOS.....                                                   | 18        |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                    | <b>19</b> |
| 3.1 APRESENTAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....                                 | 19        |
| 3.1.1 Pimenta ( <i>Capsicum chinense</i> ).....                        | 19        |
| 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS-CAROTENOIDES.....                              | 22        |
| 3.2.1 Carotenoides em Pimentas.....                                    | 23        |
| 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES.....                           | 25        |
| 3.3.1 Métodos Convencionais.....                                       | 25        |
| 3.3.2 Métodos não convencionais.....                                   | 27        |
| 3.3.2.1 Métodos não convencionais- Extração por Ultrassom.....         | 27        |
| 3.3.2.2 Métodos não convencionais- Extração por Enzimas.....           | 28        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                      | <b>29</b> |
| 4.1 COLETA DA MATERIA-PRIMA E OBTENÇÃO DA POLPA.....                   | 29        |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS POLPAS DE PIMENTA.....                          | 30        |
| 4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS.....                      | 30        |
| 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS.....                          | 32        |
| 4.4.1 Elaboração de Curvas De Calibração.....                          | 33        |
| 4.4.2 Quantificação de CT- Amostra in natura.....                      | 35        |
| 4.4.3 Quantificação de CT- Extratos obtidos dos métodos estudados..... | 35        |
| 4.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....                                           | 36        |
| 4.5.1 Extração dos Carotenoides - Método Convencional.....             | 36        |
| 4.5.2 Extração dos Carotenoides- Método Não- Convencional-<br>EAU..... | 37        |
| 4.5.3 Extração dos Carotenoides- Método Não- Convencional -EAE.....    | 39        |
| 4.6 IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS CAROTENOIDES.....                 | 42        |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                           | 43        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                   | <b>44</b> |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....                               | 44        |
| 5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS.....                      | 46        |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS.....                                                                         | 48        |
| 5.3.1 Quantificação de CT- Amostra in natura.....                                                                     | 48        |
| 5.4 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES.....                                                                                     | 49        |
| 5.4.1 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro por solventes.....                                                | 49        |
| 5.4.2 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro por Ultrassom.....                                                | 52        |
| 5.4.3 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro por Maceração Enzimática..                                        | 54        |
| 5.4.3.1 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro ( <i>Capsicum chinense</i> ) por<br>ME - Escala de Bancada..... | 55        |
| 5.4.3.2 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro ( <i>Capsicum chinense</i> ) por<br>ME - Escala Piloto.....     | 59        |
| 5.5 IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS CAROTENOIDES.....                                                                | 61        |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                               | <b>68</b> |
| <b>7 REFERENCIAS.....</b>                                                                                             | <b>69</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a população mundial cresceu de maneira acentuada juntamente com aumento o interesse por estudos que proporcionasse um melhor aproveitamento dos alimentos, visando a utilização total dos recursos alimentícios, de maneira que essa população possa manter um nível de alimentação com um alto valor nutritivo e evitando, assim, maiores desperdícios (PEREIRA et al. 2003).

Recursos naturais são considerados importantes fontes de substâncias com elevado potencial bioativo, não só pela vasta quantidade de espécies vegetais existentes, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por eles sintetizados. As hortaliças e seus subprodutos vegetais possuem altos teores de vitaminas, sais minerais e compostos bioativos, os quais atuam promovendo a assimilação de outros nutrientes, além de auxiliarem na prevenção de doenças (MELO et al., 2006). O efeito protetor exercido por estes alimentos tem sido atribuído a presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os carotenos, compostos fenólicos e as vitaminas C e E (PESCHEL et al., 2006).

Os vegetais em geral possuem substâncias biologicamente ativas os quais têm impulsionado o desenvolvimento de pesquisas por produtos que contribuem com a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais. Consequentemente, as preocupações do setor industrial na tentativa de atender a essas exigências fazem com que inovadoras rotas tecnológicas sejam apresentadas, visando à elaboração de produtos que proporcione benefícios aos consumidores e ao mesmo tempo minimizem perdas econômicas (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Aliando às contribuições à saúde, compostos naturais também apresentam significativa importância para a aplicação industrial, já que os antioxidantes sintéticos, mais empregados pela indústria de alimentos (utilizado como aditivos alimentares), têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade, pois podem estar envolvidos em muitos riscos à saúde do consumidor (BARREIROS; DAVID, 2006; MOHDALY et al., 2010). Nos últimos anos cresceu o interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos.

Extratos de frutas vegetais, cereais, sementes e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e em compostos fenólicos (WOLFE; WU; LIU, 2003, MANACH et al., 2005).

Estudos descritos na literatura evidenciam o aproveitamento dos resíduos gerados pelas indústrias, centrais de abastecimentos e feiras. Peschel e colaboradores (2006), estudando pele de maçã e pêssego apontaram que o teor de compostos encontrado nesse material é duas vezes maior ao observado nas polpas desses dois frutos, demonstrando que uma riqueza em compostos bioativos está sendo desprezada e possivelmente subutilizada. Da mesma forma a alcachofra é muito utilizada pela indústria para fins alimentícios e medicinais e estudos tem demonstrado que os principais componentes químicos presentes nas folhas são os ácidos fenólicos, flavonoides e sesquiterpenos (NOLDIN et al. 2003).

O rabanete, o nabo, a couve e brócolis liberam na sua decomposição glicosinalatos que agem na defesa da planta e há indícios de que esses vegetais apresentam importantes efeitos anticarcinogênicos associados a esses compostos presentes nessa atividade biológica. Muitas das propriedades benéficas nos alimentos de origem vegetal estão associados à atividade antioxidante e as propriedades nutritivas destes compostos (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000).

Os frutos como buriti, tucumã, bacuri e umari (mari) são ricas fontes de  $\beta$ -caroteno, sendo que o buriti é o produto alimentar detentor da maior concentração conhecida de  $\beta$ -caroteno dentro da vasta gama já analisada de alimentos brasileiros. Considerando que os lipídeos na dieta estimulam a absorção intestinal dos carotenoides, os frutos de palmas podem proporcionar a vantagem adicional de possuírem elevada biodisponibilidade destes compostos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Ao se falar de carotenoides, cabe mencionar que, no caso da zeaxantina, como todos os carotenoides, não é sintetizada pelo organismo humano. Altas quantidades de zeaxantina podem ser obtidas a partir de suplementos alimentares e alimentos enriquecidos. Por outro lado, carotenoides como a luteína apresentam ocorrência natural, encontrada predominantemente em alimentos verde-escuros e vegetais folhosos como espinafre, couve e rúcula. A



zeaxantina, responsável pela cor amarela, tem ocorrência natural (em escala infinitamente menor), em alimentos como abobrinha, pimentas, milho, pimentão e flores de algumas hortaliças (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

No que refere à extração e obtenção desses biocompostos, Farias (2013) relata que têm se estudado novas técnicas e ferramentas que buscam ampliar o rendimento dos processos, como adição de complexos enzimáticos sintéticos entre outros recursos.

Neste contexto, algumas etapas preliminares devem ser realizadas para facilitar o processo de extração e conservar os compostos antioxidantes, sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor (AZIZAH; RUSLAWATTI e TEE, 1999; VEKIARI et al. 1993). Nisto, os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados, e ainda peneirados ou moídos antes do processo de extração. Assim, segundo Juntachote e Berghofer (2005), os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração e as enzimas lipoxigenases tornam-se inativas.

Acredita-se, assim, ser de fundamental importância apontar e disponibilizar condições tecnológicas principalmente àquelas que possibilitem realizar a recuperação da biomassa residual de fontes naturais (frutas, hortaliças, especiarias), gerada pelas indústrias, centrais de abastecimentos e feiras, que, na atual circunstância, são totalmente descartados, transformando-os em produtos de grande potencial mercadológico.

Neste contexto, pretende-se estudar um material comumente descartado, uma vez que, além de possibilitar a disponibilidade de novas fontes de biocompostos, também se reaproveita um subproduto anteriormente considerado lixo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar três métodos diferentes para extrair carotenoides de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*).

### 2.2 ESPECIFICOS

- ✓ Obter uma polpa de pimenta que favoreça o processo de extração dos carotenoides;
- ✓ Caracterizar quanto à composição centesimal a polpa de pimenta;
- ✓ Caracterizar as preparações enzimáticas comerciais quanto à atividade enzimática;
- ✓ Estudar o método de extração via solvente variando tipo de solvente e tempo de incubação;
- ✓ Estudar o método de extração via maceração enzimática, variando tipo de enzima, temperatura, tempo de incubação e concentração enzimática;
- ✓ Estudar o método de extração via ultrassom variando o tipo e a concentração de solvente;
- ✓ Identificar o perfil de carotenoides nos extratos de pimenta pelo método de CLAE.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 APRESENTAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

##### 3.1.1 Pimenta (*Capsicum chinense*)

Pimentas são vegetais empregados na alimentação com a finalidade de produzir sensação picante e de calor, causadas pela sua composição química, capaz de estimular as papilas gustativas da boca. Basicamente, são conhecidos dois gêneros de pimentas, o *Piper* e o *Capsicum*, sendo *piper* o mais antigo e pertencente a família das piperáceas. O princípio ativo mais importante deste gênero é o composto chamado de piperina (BONTEMPO, 2007).

O Brasil é o segundo maior produtor de pimenta do mundo (RISTORI et al., 2002) e centro da diversidade do gênero *Capsicum* (REIFSCHNEIDER, 2000), o qual se difunde em todas as regiões brasileiras, sendo cultivado principalmente nas regiões sudeste, centro oeste e nordeste, contemplando quatro espécies domesticadas: *Capsicum annuum* Var. *annuum* (pimentão, pimenta americana - doce, jalapeño); *Capsicum baccatum* Var. *pendulum* (dedo-de-moça e cambuci); *Capsicum chinense* (pimenta de cheiro, bode, cumari-do-pará, murupi); *Capsicum frutescens* (malagueta) (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2009). Dentre essas se destacam a pimenta de cheiro, a pimenta malagueta e a dedo-de-moça, bastante apreciadas e utilizadas na culinária do nordeste brasileiro, especialmente no estado do Piauí (DONALD, 2009).

No Brasil são realizados diferentes usos das pimentas e, para cada aplicação, existe um tipo de preparo. As pimentas podem ser saboreadas frescas, puras, desidratadas ou ainda frescas em molhos (SILVA, 1996). São comercializadas para o consumo in natura, como conservas caseiras e para exportação do produto industrializado, como molhos, etc (WAGNER, 2003).

As pimentas foram, provavelmente, os primeiros aditivos alimentares aplicados pelas antigas civilizações do México, bem como da América do Sul. Esses povos conheciam a contribuição daqueles frutos para o aroma, cor e sabor dos alimentos. As pimentas eram usadas regularmente para tornar a

ingestão de carnes e cereais mais atraente. Além disso, possuíam ação antimicrobiana, protegendo os alimentos contra a contaminação por bactérias e fungos patogênicos e contribuindo para a saúde e longevidade daquela gente (REIFSCHNEIDER, 2000).

Pimenta de cheiro, como é conhecida a espécie *C. chinense* na região Norte e, principalmente no estado do Pará, em geral é consumida verde, portanto considerada "passada" e descartada quando madura (assumindo coloração laranja- avermelhada). A Figura 2 mostra a espécie em questão em diversos estágios do processo de maturação.



Figura 1: Pimenta *C. chinense* em diversos estágios de maturação. Fonte:

<http://www.ethno-botanik.org/Capsicum/Devils-Tongue-Red/Devils-Tongue-Red-Capsicum-chinense-en.html>

As pimentas também contêm muitas substâncias fisiológicas ativas como ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, etc. (OGISO et al., 2008). Estas substâncias são importantes antioxidantes, agindo na prevenção contra danos ocasionados por reações de oxidação realizadas pelos radicais livres.

Características desejáveis, tais como, firmeza, uniformidade da maturação, sólidos solúveis e vitamina C (LANNES et al., 2007), presentes em *C. chinense*, despertam interesse de incluir essa espécie em programas de melhoramento da espécie mais cultivada do gênero *Capsicum*, o pimentão.

As pimentas, de modo geral, apresentam compostos que agem na promoção da saúde, tais como flavonoides, carotenoides, vitamina C, e capsaicinoides. Dentre esses compostos, flavonoides são fitoquímicos muito presentes, pelo fato de serem considerados um tipo de composto mais abundante em frutos verdes, maduros ou ainda processados. (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2010; KIM et al., 2010; LIN; TANG, 2007; SGROPPO; PEREYRA, 2009; SIM; SIL, 2008).

Enfatizando a espécie *C. chinense*, destaca-se por possuir ampla adaptação às condições de clima equatorial e tropical e por possuir grande diversidade genética, evidenciada especialmente nos frutos, os quais podem apresentar diferentes formatos, colorações, tamanhos e níveis de pungência, assim sendo uma das espécies de pimenta mais produzidas e consumidas no Brasil (LANNES et al. 2007).

Ao se falar de composição química dessa espécie, na Tabela 1 Oliveira (2011) apresenta o percentual dos principais constituintes.

Tabela 1: Composição centesimal pimenta *Capsicum chinense*; (OLIVEIRA, 2011).

| <b>Constituintes</b>         | <b>Valor</b> |
|------------------------------|--------------|
| Umidade (g/100g)             | 93,4±0,52    |
| Cinzas (mg/100g)             | 0,43±0,01    |
| Proteínas (g/100g)           | 1,08±0,00    |
| Lipídios (g/100g)            | 0,13±0,02    |
| Carboidratos totais (g/100g) | 4,94±0,04    |

### 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS- CAROTENOIDES

Os vegetais, na sua generalidade, são fontes naturais de compostos bioativos eficazes, incluindo antioxidantes, como polifenóis, vitaminas, carotenoides, ácidos graxos insaturados e açúcares redutores, os quais podem ser utilizados para diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares e na promoção da saúde como ingredientes na formulação de alimentos funcionais e nutraceuticos (Loziene et al., 2007).

Quimicamente, Mitrowska (2012) descreve os carotenoides como uma classe de hidrocarbonetos (carotenos) e seus derivados oxigenados (xantofilas), sendo constituídos por oito grupos do tipo isopreno. Devido às inúmeras ligações duplas conjugadas e os grupos terminais cíclicos, carotenoides apresentam uma variedade de estereoisômeros com diferentes propriedades físicas e químicas. As formas mais importantes comumente encontradas entre carotenoides são abreviados como estereoisômeros *E* ou *Z*-isômeros. Estereoisômeros deste tipo são interconvertíveis em solução e podem exercer uma influência considerável sobre as propriedades físicas. Isômeros *E* e *Z* não só diferem em seus pontos de fusão, solubilidade e estabilidade, mas também no que diz respeito à sua afinidade de absorção, cor e intensidade da cor.

Rodriguez-Amaya (2001) afirma que a estrutura química básica dos carotenoides pode ser alterada por ciclização, migração das duplas ligações, introdução de grupos substituintes, hidrogenação parcial, de-hidrogenação, extensão ou encurtamento da cadeia, rearranjos, isomerização ou combinações, o que resulta em uma grande diversidade de estruturas químicas.

Na indústria de alimentos, os carotenoides são utilizados principalmente como corantes, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios (TATSCH, 2008). Industrialmente, os carotenoides como o  $\beta$ - caroteno e astaxantina são utilizados como corantes naturais para alimentos ou adicionados em ração para aquicultura (AKSU; EREN, 2007).

### 3.2.1 Carotenoides em Pimentas

A figura 2 ilustra os principais carotenoides encontrados em pimentas de coloração laranja/ vermelha. Em pimentas do gênero *Capsicum*, os carotenoides são responsáveis pela variabilidade de coloração dos frutos, sendo estes sintetizados durante os diferentes estádios de amadurecimento (LUO et al., 2011).

Os principais carotenoides responsáveis pela coloração das pimentas *Capsicum*, segundo Marín et al. (2004) são as xantofilas capsantina, capsorubina (de coloração vermelha) e  $\beta$ -caroteno e zeaxantina (coloração amarelo/laranja). Deli et al. (2001), ainda estudando os carotenoides mais representativos em frutos de *Capsicum*, listaram e quantificaram capsantina 37%, zeaxantina 8%, curcubixantina A 7%, capsorubina 3,2% e  $\beta$ -caroteno 9%.

Giuffrida et al. (2013) identificaram, por cromatografia líquida, mais de 50 tipos de carotenoides estudando 12 cultivares de três espécies (*Capsicum chinense*, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*).

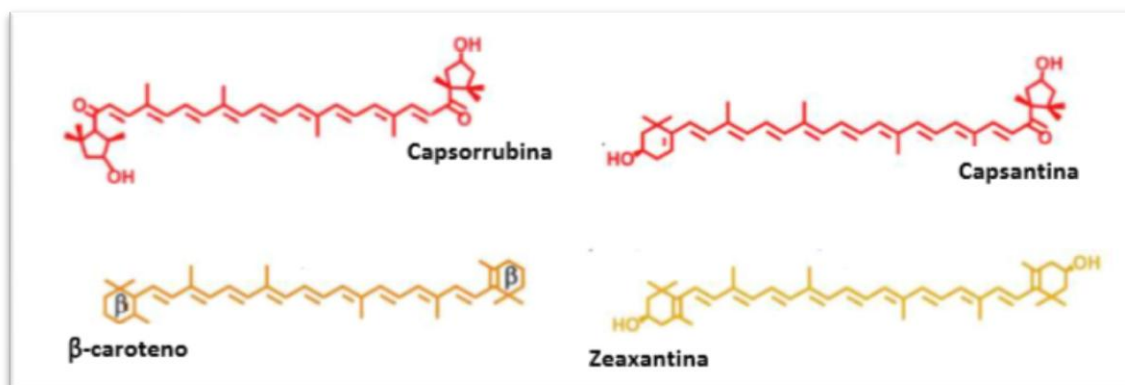


Figura 2: Fórmula Química dos Principais Carotenoides de Pimenta (Guzman et al. 2010)

Estudos recentes têm indicado que a zeaxantina, juntamente com a luteína, pode diminuir o risco de degeneração macular relacionada à idade (BEATTY et al., 1999). Sabe-se que a concentração do carotenoide macular pode ser manipulada a partir da ingestão de zeaxantina. Nesse contexto, certas algas podem servir como um processo contínuo e uma fonte confiável de zeaxantina, porque podem ser cultivadas em biorreatores em larga escala (CHEN et al., 2005).

O espectro visível desse derivado de  $\beta$ -caroteno assemelha-se ao do  $\beta$ -caroteno. A zeaxantina se caracteriza como dihidroxi carotenoide, cuja presença e posição desses grupos são evidenciadas pela resposta positiva à acetilação com ácido acético anidro e negativa para com a metilação metanol acidificado, respectivamente (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Sajilata et al. (2008), em suas análises químicas, descreveu a zeaxantina como sendo um pigmento formado por 40 átomos de carbono, com 9 duplas ligações conjugadas, fórmula molecular  $C_{40}H_{56}O$  e peso molecular de 568,88 daltons.



### 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

A extração de compostos naturais constitui um passo essencial na indústria de compostos bioativos. Por outro lado, a qualidade e constituição dos extratos se encontram estreitamente relacionados à técnica de obtenção dos mesmos.

Rodriguez- Amaya (2001) ao discorrer sobre os métodos de caracterização dos carotenoides afirma que são vários os fatores que fazem desta uma análise inerentemente difícil: a) a existência de um grande número de carotenoides, b) a variabilidade qualitativa e quantitativa da composição dos alimentos, c) a ampla variação nas quantidades dos carotenoides dentro de um mesmo alimento, d) a distribuição não uniforme dos carotenoides entre amostras e ainda dentro de uma mesma amostra, e) a natureza variável das matrizes alimentícias e f) a susceptibilidade dos carotenoides à isomerização e oxidação durante a análise ou durante a estocagem da amostra antes da análise.

Os compostos bioativos a partir de materiais de plantas podem ser extraídos por várias técnicas de extração clássicas. A maioria dessas técnicas baseia-se na extração utilizando diferentes solventes e na aplicação de calor e /ou de mistura de duas ou mais ferramentas. A fim de obter bioativo compostos de plantas, as técnicas clássicas já existentes são: a extração Soxhlet, maceração e hidrodestilação (AZMIR, 2013).

Além desses, métodos não convencionais, tais como, extração por ultrassom, extração por fluido supercrítico e extração por enzimas também têm sido utilizadas por pesquisadores na atualidade.

#### 3.3.1 Métodos Convencionais

Rodriguez-Amaya (2001) afirma que o método geral de extração de carotenoides consiste na aplicação de acetona, seguida de partição com éter de petróleo. Nisto, o método deve ser otimizado para cada matriz, especialmente em relação ao preparo da amostra analítica, condições de extração e demais condições analíticas.

Ao se falar da utilização de solventes de diferentes polaridades para extração de biocompostos, listam-se como mais utilizados, na maioria dos

trabalhos pesquisados, diclorometano, acetato de etila, metanol, etanol (BAE, 2012).

Akhtar e Bryan (2008), ao utilizar a CLAE para quantificar carotenoides em alimentos processados, comprimidos e cápsulas de gel, verificaram que o método é adequado para análise de vários tipos de biocompostos em diversos produtos, como sucos, purês, géis e comprimidos. As principais vantagens do método são a reprodutibilidade e a eliminação da etapa de saponificação, além da utilização de pequenas quantidades de amostra.

Em relação ainda à aplicação de CLAE, Nunes e Mercadante (2006) afirmam que colunas de fase reversa  $C_{18}$  e  $C_{30}$  vêm sendo amplamente utilizadas para distinção de carotenoides. Em geral, separações mais eficazes de carotenos e isômeros têm sido demonstradas com  $C_{18}$  poliméricas do que com  $C_{18}$  monoméricas. Relatam ainda que, em coluna  $C_{18}$  monomérica, não há separação satisfatória de isômeros geométricos (ou *cis-trans*) de carotenoides apolares, como é o caso dos carotenoides luteína e zeaxantina. Em contrapartida, a vantagem da coluna  $C_{30}$  (polimérica) em relação à coluna  $C_{18}$  é a possibilidade de distinguir um número ainda maior de isômeros, além de ser a única coluna capaz de separar isômeros de carotenoides não simétricos.

A técnica analítica mais utilizada para identificação de carotenoides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entretanto, mesmo esta técnica está sujeita a várias fontes de erros, tais como: a) incompatibilidade do solvente de injeção com a fase móvel, b) identificação errônea, c) impureza, instabilidade e inexistência de padrões, d) quantificação de picos muito sobrepostos, e) baixa recuperação do analito na coluna cromatográfica, f) falta de exatidão no preparo das soluções padrão e no procedimento de calibração, g) erros de cálculo (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004).

### 3.3.2 Métodos Não Convencionais

#### 3.3.2.1 Métodos não convencionais- Extração por ultrassom

A técnica de ultrassom baseia-se na formação de ondas ultrassônicas de alta frequência, capazes de provocar cavitação devido à expansão e contração dos ciclos que o material percorre quando submetidos ao ultrassom. Estes ciclos de perturbação podem quebrar as paredes das células da matriz vegetal, favorecendo a penetração do solvente e a transferência de massa, aumentando assim a taxa de extração (SANTOS, 2015).

Barbero et al. (2008) afirmaram que o ultrassom exerce um efeito mecânico, permitindo maior interação entre o solvente e a amostra, aumentando a superfície de contato entre a fase sólida e líquida. Isso, juntamente com a transferência de massa reforçada e perturbação significativa de células, através de bolha de cavitação, aumenta a liberação de produto do meio intracelular.

De acordo com Lambropoulou (2006), a melhoria da eficiência de extração de compostos orgânicos por ultrassom é atribuída ao fenômeno da cavitação produzido no solvente pela passagem de um ultrassom. A utilização de maiores temperaturas pode aumentar a eficiência da extração processo, devido ao aumento do número de bolhas de cavitação formado (WU, 2001).

Romdhane e Gourdon (2002) observaram que a frequência de ultrassom tem grandes efeitos sobre a extração de rendimento e cinética. No entanto, os efeitos dos ultrassons em rendimento de extração e cinética variam de acordo com a natureza do material vegetal e do biocomposto a ser extraído.

Comparado com os métodos convencionais, a EAU é um dos sistemas de extração mais simples, de baixo custo e pode ser operado rapidamente em uma ampla gama de solventes para preparações em grande escala adequados para fins industriais (LEE ; LIM, 2007). Esta técnica tem sido utilizada para extrair vários compostos orgânicos a partir de diferentes matrizes, incluindo fenólicos em cremes cosméticos, pesticidas clorados em pássaro fígados, ácidos orgânicos em uvas, compostos fenólicos a partir de morangos ou isoflavonas de soja (LAMBROPOULOU, 2006).

### 3.3.2.2 Métodos não convencionais- Extração por Maceração Enzimática

Ao discorrer sobre extração assistida pelo uso de enzimas, sejam de preparações enzimáticas comerciais ou naturais, Laroze (2010) ressalta que a extração de base de enzimas de compostos bioativos de plantas é uma alternativa potencial para os métodos convencionais de extração à base de solventes.

Em se tratando de uso de enzimas para extração de CT, sabe-se que a disponibilidade desse biocomposto é favorecida pela quebra da parede celular vegetal provocada pela ação enzimática.

Preparações enzimáticas comerciais têm sido utilizadas cada vez mais pelas indústrias de alimentos, uma vez que, segundo a RDC nº53, podem ser aplicadas o quanto forem necessárias (não havendo limites pré-determinados de concentrações), (BRASIL, 2014).

Em relação aos fatores que interferem no rendimento da extração via enzimática, Niranjan e Hanmoungjai (2002) listam composição e concentração enzimática, tamanho dos materiais vegetais (superfície de contato), proporção sólido/volume de água e tempo de hidrólise, reconhecidos como fatores-chave para a extração.

Ao se falar de extração assistida por enzimas, afirma-se que complexos enzimáticos são comumente utilizados nas indústrias de vinho, com intuito de melhorar a extração de cor e de taninos (NOVOZYMES, 2005).

Santamaria et al. (2000) aplicaram enzimas no processo de extração de capsaicinoides e carotenoides de pimentas (*Capsicum annum L.*) utilizando etanol como solvente. Por outro lado, a EAE é reconhecida como tecnologia "eco-friendly" (*Envirotech*, tecnologia verde (*greentech*) ou tecnologia limpa (*cleantech*)) para a extração de compostos bioativos e óleo, já que usa água como solvente em vez de produtos químicos orgânicos (PURI et al., 2012).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE MATÉRIA-PRIMA E OBTENÇÃO DA POLPA

As matrizes foram adquiridas no mercado Ver-o-peso, localizado no centro comercial de Belém-PA e encaminhadas para o Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI) da Universidade Federal do Pará, onde o processamento da matéria-prima seguiu as etapas descritas no fluxograma abaixo (Figura 3). A sanitização das pimentas foi realizada com 200 ppm hipoclorito de sódio durante 15 min, a trituração foi feita em liquidificador doméstico da marca Arno e a pesagem em balança semi-analítica.

Uma parte da polpa processada foi liofilizada em liofilizador (marca LIOTOP, modelo L101 a -50 °C) durante 30 h com a finalidade de aumentar a superfície de contato e, com isso, facilitar a extração dos carotenoides no método convencional.



Figura 3: Fluxograma do processo de obtenção da polpa de pimenta (*Capsicum chinense*) madura.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS POLPAS DE PIMENTA

As polpas in natura e liofilizadas foram caracterizadas quanto à composição físico-química, sendo determinados os seguintes constituintes:

*Umidade*- Método nº 920.107. (AOAC, 2011);

*Lipídios Totais*- Método nº 963.15 (AOAC, 2011);

*Cinzas*- Método nº 972.15. (AOAC, 2011);

*Proteína total*- Método nº 920.109. (AOAC, 2011);

Carboidratos totais calculados pela diferença entre a somatória dos valores obtidos nas determinações anteriores. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e  $\pm$ desvio padrão.

## 4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS

A quantificação da atividade antioxidante foi realizada na amostra in natura, baseado no método do radical ABTS conforme descrito por Rufino et al. (2007). Para o preparo do extrato de pimenta utilizou-se 10 g de pimenta madura in natura, sendo os demais parâmetros mantidos.

Preparou-se o radical ABTS<sup>•+</sup>, a partir da reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio a 2,45 mM na obtenção da concentração final, mantido a temperatura ambiente e sob abrigo de luz durante 16 horas. Após esse tempo, a solução foi diluída em álcool etílico PA até a obtenção de uma solução com absorbância de 0,70 ( $\pm$  0,05) a 734 nm.

Quatro pontos foram preparados para obtenção da curva de calibração do Trolox (Figura 4), sendo os volumes do radical de 0,5 mL; 2,5 mL; 5 mL, 7,5 mL e 10 mL, diluídos para 10 mL de álcool etílico e comparadas com o branco. Ainda utilizando esses volumes, preparou-se o extrato da amostra para reagirem com ABTS, sendo que os balões foram, aqui, aferidos com água destilada.

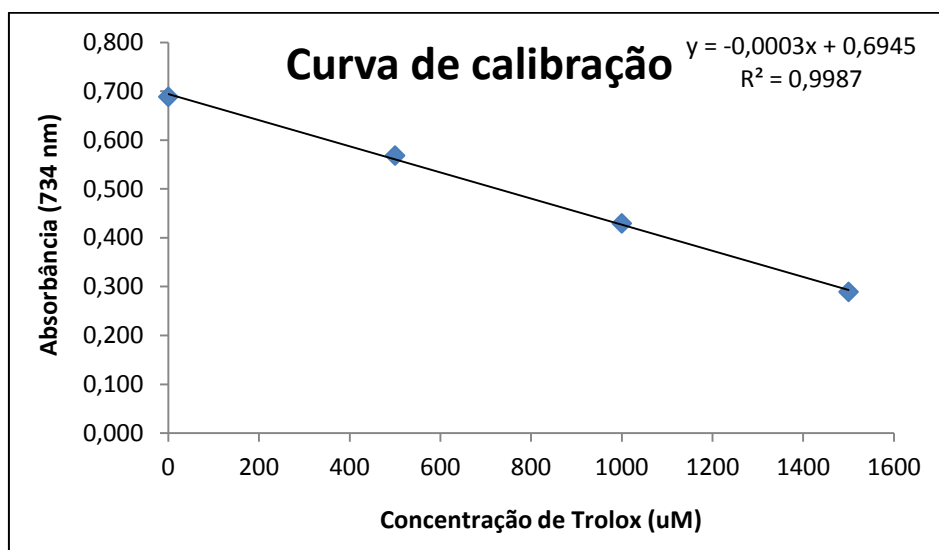


Figura 4: Curva de calibração do Radical Trolox para pimenta madura.

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato para reagirem com 3 mL de solução de ABTS, após a homogeneização, foi feita a leitura (734 nm) após 6 minutos da mistura e utilizando álcool etílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Continuando a análise, plotou-se os dados em um gráfico de dispersão absorbância *versus* concentração em mM de Trolox. Para calcular a Atividade antioxidante, substituiu-se a equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão Trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de Trolox.

Dentre os métodos mais comumente realizados em laboratórios, o método ABTS apresenta algumas vantagens relativamente ao método do DPPH, pois é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, enquanto o DPPH só pode dissolver-se em meio orgânico (NOGUEIRA, 2013).

O mesmo procedimento foi realizado para a pimenta in natura verde, com a finalidade de comparar a atividade antioxidante entre as duas amostras. A figura 5 ilustra a curva de calibração do radical Trolox para a pimenta verde.

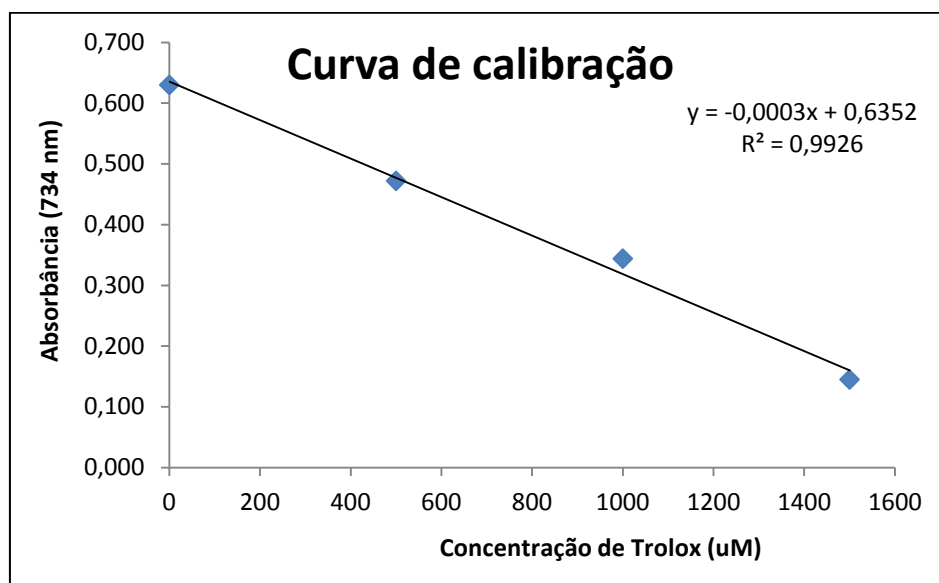


Figura 5: Curva de calibração do Radical Trolox para pimenta verde.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS (CT)

O teor total de carotenoides foi determinado a partir do método espectrofotométrico de acordo com a metodologia descrita por Godoy e Rodriguez-Amaya (1994), com adaptações (seção 4.4.2).

Para o cálculo da concentração de caroteno construiu-se uma curva de calibração padrão, usando padrões de  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. A curva padrão corresponde à relação gráfica entre os valores de absorbância (A) e concentração. Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). Com isso, segundo Rodrigues e Santos (2011), se houver proporcionalidade entre a absorbância e a concentração de uma substância, pode-se determinar a concentração dessa substância em amostras com concentração desconhecida.

O preparo das soluções padrão seguiu as indicações do rótulo. Para o padrão de  $\beta$ -caroteno (Tipo I, sintético  $\geq 93\%$  uv/ powder. Marca: Sigma Lot:#SLBC1996V/) preparou-se duas soluções padrão, sendo uma de padrão puro (em cápsula) e outra de padrão sintético (em pó). Para as diluições, o padrão puro foi diluído em 50 mL de Hexano. Enquanto que, para o padrão sintético, após a correção de concentração para 100 %, pesou-se 0,0069 g



para se dissolver também em 50 mL de Hexano. A partir dessas diluições, obteve-se as concentrações das soluções 0,132 mg / mL e 0,128 mg / mL para os padrões sintético e puro, respectivamente. A etapa seguinte foi a de varredura em espectrofotômetro na faixa de 500 a 700 nm, luz uv.

Em relação ao preparo da solução padrão de zeaxantina, diluiu-se 1000 µg do carotenoide em 1 mL de álcool etílico, obtendo uma curva de calibração de cinco pontos.

#### 4.4.1 Elaboração de curvas de calibração

Inicialmente, as análises de quantificação de carotenoides totais e as curvas de calibração dos padrões foram elaboradas, com intuito de avaliar se os carotenos quantificados se encontravam na mesma faixa de absorção de luz.

Foram feitas três curvas padrão que apresentaram valores de  $R^2$  aproximadamente 1 (conforme demonstrado nas figuras 6,7 e 8) . A partir da obtenção dessas curvas e da absorbância dos extratos foi possível calcular a concentração de carotenoides do conteúdo extraído.

Segundo exposto nos gráficos, verificou-se que as equações de reta são relações entre concentrações de carotenoides e absorbância aferida nas análises espectrofotométricas, e em razão disso, a partir da análise dos valores do coeficiente de variação ( $R^2$ ), pode-se sugerir que os valores foram satisfatórios.

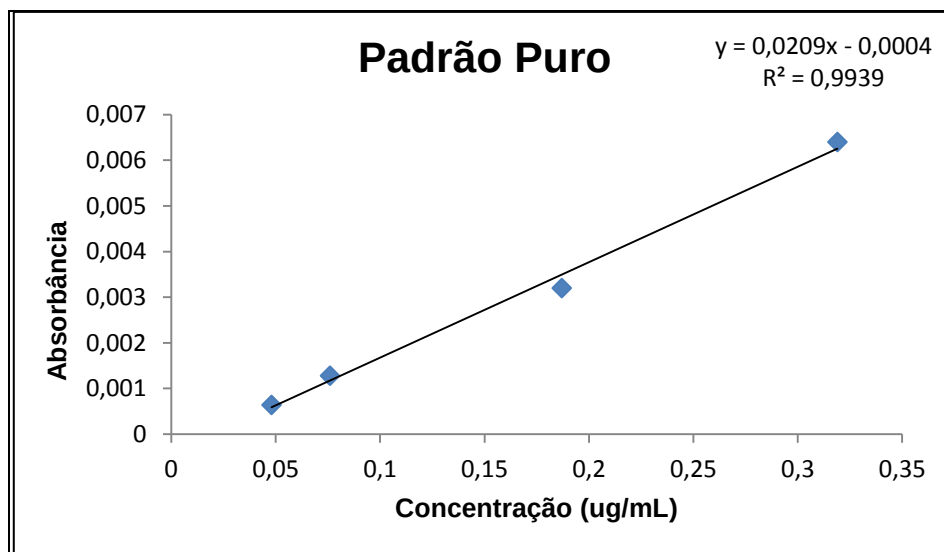


Figura 6: Curva de calibração do Padrão Puro de β-caroteno

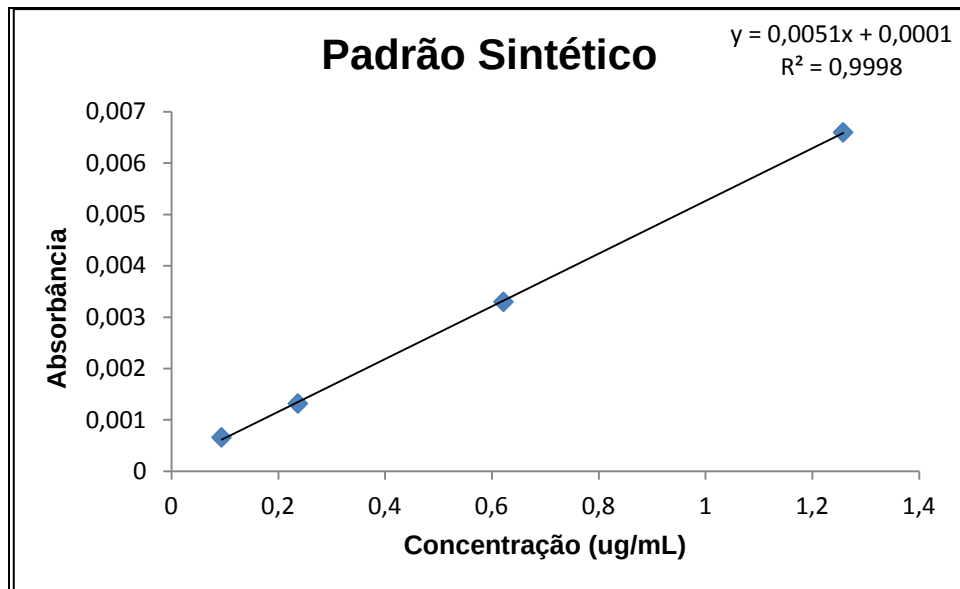
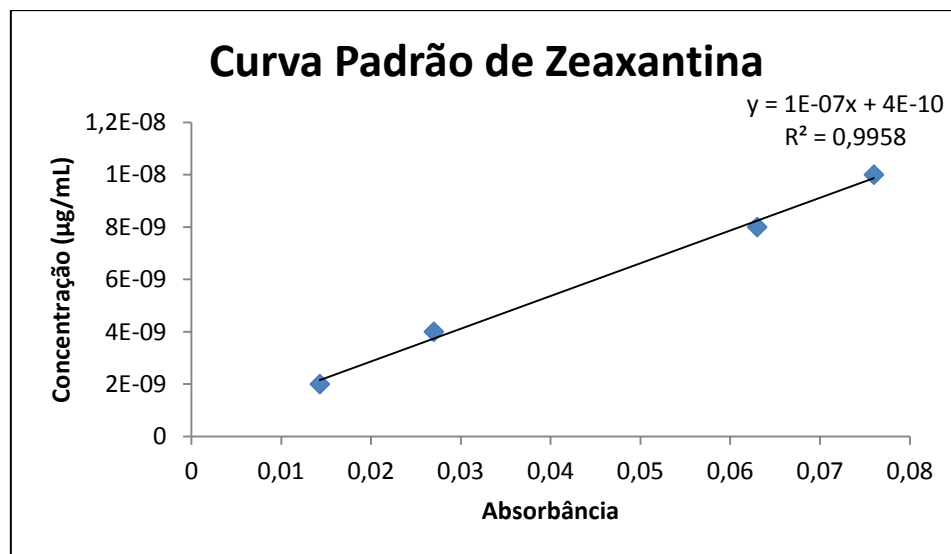
Figura 7: Curva de calibração do Padrão Sintético de  $\beta$ -caroteno

Figura 8: Curva de calibração do Padrão de Zeaxantina

#### 4.4.2 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS - Amostra in natura

Utilizando almoxariz e pistilo, macerou-se 2,5 g de amostra com aproximadamente 5 g de CELITE 545 (Sigma Aldrich) e lavou-se com cerca de 80 mL de acetona resfriada, filtrando a mistura com papel de filtro qualitativo em um funil de büchner. As etapas de lavagem e filtração foram repetidas até que o resíduo ficasse incolor. Em seguida, transferiu-se cuidadosamente o filtrado para um funil de separação âmbar e particionou-se, em duas fases, com 30 mL de éter de petróleo e água destilada até a remoção total da acetona para a fase inferior. Depois coletou-se a fase superior, constituída do extrato em um erlenmeyer e adicionou-se sulfato de sódio anidro para remoção de água eventual, transferiu-se para uma proveta âmbar e anotou-se o volume final. Foi feita a leitura em espectrofotômetro Car 50conc UV-VIS, com  $\lambda$  máximo de 450 nm (para  $\beta$ -caroteno) e 424 nm (para zeaxantina). O teor de carotenoides totais foi determinado em  $\mu\text{g} / \text{g}$  (equação 1), utilizando como coeficientes de absorvidade ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) 2592 e 2348, respectivamente para  $\beta$ -caroteno e zeaxantina.

$$\text{CT } (\mu\text{g/g}) = \frac{10^4 \times \text{Absorbância} \times \text{Volume (mL)}}{\text{Peso da amostra (g)} \times A^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

Equação 1

#### 4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS - Extratos obtidos dos métodos estudados

A quantificação de CT dos extratos decorreu de forma semelhante à análise da amostra in natura, sendo que, para essas amostras, partiu-se de 3g de extrato líquido (filtrado) e coletou-se, no final, 30 mL de extrato suspenso em éter de petróleo na fase superior. Para todos os extratos, realizou-se leitura em espectrofotômetro Car 50 UV-VIS, seguindo os mesmos passos da análise descrita no item 4.4.1.

## 4.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Experimentou-se técnicas de extração convencional e não convencional. O método convencional aplicado foi de extração por solventes de diferentes polaridades (em soxhlet), indicados para fins alimentícios. Os métodos não convencionais estudados foram extração assistida por ultrassom e extração assistida por enzimas.

### 4.5.1 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES - Método Convencional - Extração por Solventes

A extração de carotenoides com utilização de solventes de diferentes polaridades foi realizada usando dois solventes orgânicos separadamente, baseado na metodologia descrita por Santos et al. (2015).

Os solventes hexano (apolar) e álcool etílico (polar) foram escolhidos de acordo com o preparo das soluções padrão. Pesou-se 5 g de polpa de pimenta liofilizada em cartuchos de papel de filtro a serem extraídos em 150 mL de solvente. Os tempos de extração foram 2, 4 e 6 h. As etapas desse método de extração seguiram a sequência expressa na Figura 9. Todos os procedimentos empregados foram feitos ao abrigo da luz para evitar degradação do biocomposto no extrato durante a operação de extração.

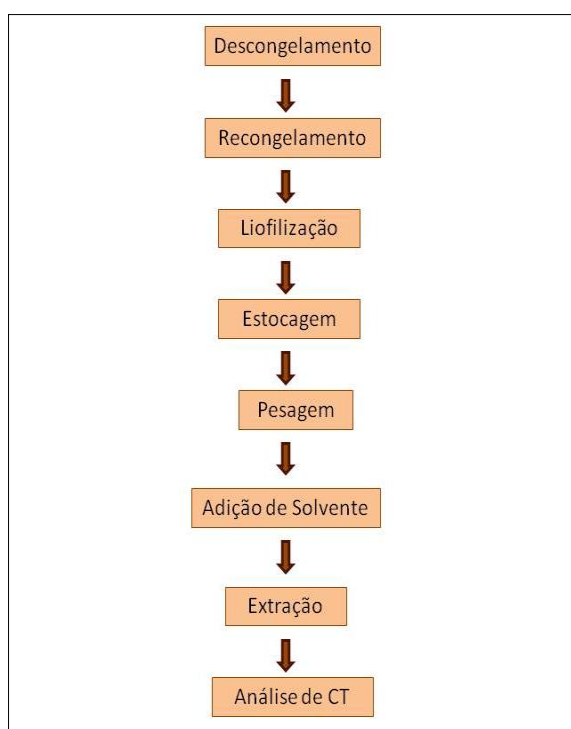


Figura 9: Fluxograma do processo de extração de carotenoides via solvente em Soxhlet.

#### 4.5.2 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES - Método Não Convencional - Extração assistida por Ultrassom.

Os tratamentos utilizando ultrassom basearam-se na metodologia proposta por Cai et al. (2003), com adaptações. O tempo de extração empregado foi de 30 s a 30 °C com potência de 100 W e proporção polpa/ volume de solvente de 1: 10 (p/v).

Com intuito de verificar a eficiência do ultrassom com os solventes utilizados no método convencional, optou-se por extrair os carotenoides adicionando hexano e álcool etílico, tanto isolados quanto combinados, de acordo com as descritas na tabela 2.

O fluxograma desse método de extração apresenta a sequência de etapas realizadas conforme visualiza-se na figura 10. Pesou-se 5g de pimenta madura in natura em um béquer de 250mL coberto com papel alumínio (para proteger da luz), onde foram adicionados 50mL de solvente nas proporções expostas na tabela 2.

O equipamento utilizado foi ultrassom (Figura 11) com as seguintes especificações: Marca Unique; Disruptor de Células; Modelo Ultrassom de ponteira; Microponta (usada para volumes até 200 mL); Frequência 20 khz; Potência 500 W.

Tabela 2: Combinação de solventes utilizados no método de extração por ultrassom.

| <b>Ensaio</b> | <b>Volume de Hexano (mL)</b> | <b>Volume de Etanol (mL)</b> |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>1</b>      | 0                            | 50                           |
| <b>2</b>      | 5                            | 45                           |
| <b>3</b>      | 10                           | 40                           |
| <b>4</b>      | 15                           | 35                           |
| <b>5</b>      | 20                           | 30                           |
| <b>6</b>      | 25                           | 25                           |
| <b>7</b>      | 30                           | 20                           |
| <b>8</b>      | 35                           | 15                           |
| <b>9</b>      | 40                           | 10                           |
| <b>10</b>     | 45                           | 5                            |
| <b>11</b>     | 50                           | 0                            |



Figura10: Fluxograma do processo de extração de carotenoides por Ultrassom.



Figura 11: Ultrassom de ponteira.

#### 4.5.3 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES - Método Não Convencional - Extração assistida por Enzimas

##### 4.5.3.1 Preparações Enzimáticas Comerciais

As preparações enzimáticas utilizadas foram Viscozyme L e Celluclast 1,5 L, cedidas gentilmente pela Novo Nordisk® Bioindustrial do Brasil Ltda.

##### 4.5.3.2 Atividade Enzimática

As preparações enzimáticas foram analisadas quanto as suas atividades poligalacturonases (COURI, 1993), pectinametilesterases (KHANNA et al., 1981), pectinaliases (ZETELAKI-HORVATH, 1982), amilases (PINTO, 2002), celulasas (PINTO, 2002), invertases (MOURA et al., 2007) e xilanases (GOMES et al., 1992).

##### 4.5.3.3 Extração por Maceração Enzimática em Escala de Bancada

A maceração enzimática foi realizada conforme o fluxograma da Figura 12.

Pesou-se 10 g de polpa de pimenta in natura e diluiu-se em 20 mL de água destilada, de acordo com Vieira (2013). Em seguida, a mistura recebeu as enzimas e foi levada para incubação em shaker orbital (Marca Tecnal; Modelo Finalizada a incubação, a mistura recebeu um branqueamento a 75 °C durante 5 min, seguido de resfriamento em banho de gelo, conforme Aquino (2012), para inativar as enzimas, depois filtrou-se a mistura a vácuo e obteve-se o filtrado (extrato líquido).

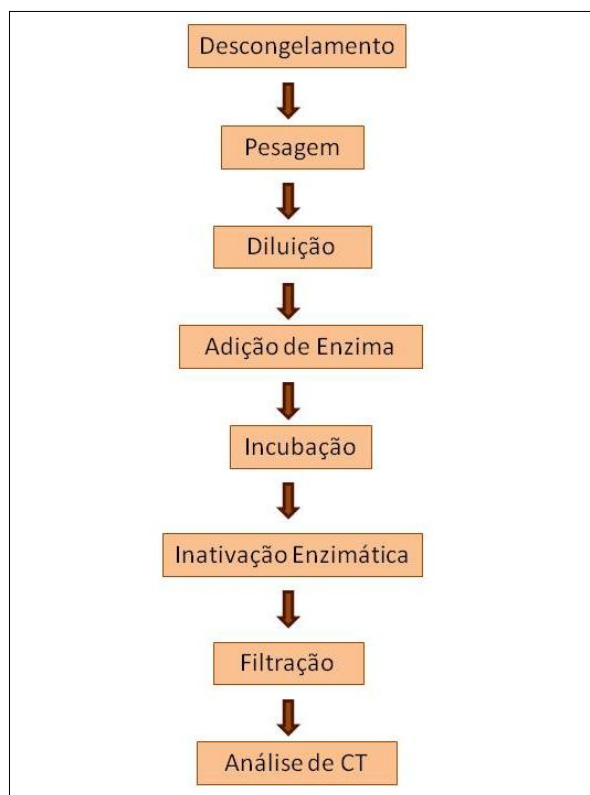


Figura 12: Fluxograma do processo de extração por maceração enzimática.

No que se refere aos testes realizados nessa etapa, os mesmos se deram em uma sequência de experimentos descritos a seguir:

a) Experimento I: Inicialmente aplicou-se um planejamento experimental fracionário  $2^{4-1}$  (Tabela 3), no qual selecionou-se quatro variáveis independentes (tempo de incubação, Temperatura de incubação, agitação e volume de preparação enzimática). A preparação enzimática utilizada foi a Celluclast 1,5 L, baseado nos estudos de Farias (2013), cuja análise de AIR (Resíduos insolúveis em Álcool) de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) resultou em maiores teores de celulose + lignina (11,04 g/100 g) do que pectina (3,80 g/100 g) e hemicelulose (4,02 g/100 g). Cada ensaio foi submetido a análise de quantificação de carotenoides totais (seção 4.3.2), em triplicata.

b) Experimento II: Com base nos resultados obtidos no experimento I, realizou-se um outro teste no qual avaliou-se três variáveis independentes nas seguintes condições: tempo de incubação (1, 2 e 3 h), tipo de preparação enzimática (Viscozyme L e Celluclast 1,5 L) e volume de



preparação enzimática (100, 200 e 300 µL). Cada ensaio foi submetido à análise de quantificação de carotenoides totais ( seção 4.3.2), em triplicata.

Tabela 3: Planejamento Fracionário 2<sup>4-1</sup>.

| <b>Ensaio</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Tempo (h)</b> | <b>Enzima (µL)</b> | <b>Agitação (RPM)</b> |
|---------------|-------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>1</b>      | 25                      | 1                | 200                | 100                   |
| <b>2</b>      | 35                      | 1                | 200                | 200                   |
| <b>3</b>      | 25                      | 3                | 200                | 200                   |
| <b>4</b>      | 35                      | 3                | 200                | 100                   |
| <b>5</b>      | 25                      | 1                | 400                | 200                   |
| <b>6</b>      | 35                      | 1                | 400                | 100                   |
| <b>7</b>      | 25                      | 3                | 400                | 100                   |
| <b>8</b>      | 35                      | 3                | 400                | 200                   |
| <b>9 (C)</b>  | 30                      | 2                | 300                | 150                   |
| <b>10 (C)</b> | 30                      | 2                | 300                | 150                   |
| <b>11 (C)</b> | 30                      | 2                | 300                | 150                   |

#### 4.5.3.4 Extração por Maceração Enzimática em escala Piloto

A partir dos resultados obtidos na extração em escala de bancada (em erlenmeyers de 250 mL), realizou-se um teste em escala piloto, utilizando um bioreator encamisado (Marca: New Brunswick (USA); Modelo BIOFLO®; Capacidade útil: 3,5L), como mostra a Figura 13.

As etapas foram semelhantes às executadas em escala de bancada (Figura 12). Sendo que, nessa operação pesou-se 940 g de pimenta in natura madura e adicionou-se 1880 mL de água destilada e, após a estabilização da temperatura (30°C), adicionou-se a preparação enzimática comercial. As condições dessa maceração foram realizadas com base nos resultados obtidos em escala de bancada, onde: temperatura de incubação (30 °C), tempo de incubação (1 h), preparação enzimática (Celluclast 1,5 L), volume de Celluclast 1,5 L (18,8 mL). A agitação foi elevada para 250 RPM para favorecer a homogeneização da mistura (polpa+água+enzima), uma vez que usou-se um volume total maior.



Figura 13: Bioreator- Extração por maceração enzimática em escala piloto.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS CAROTENOIDES

Para identificação cromatográfica do perfil de carotenoides dos métodos estudados, os extratos líquidos obtidos a partir da análise de quantificação dos carotenoides totais (item 4.3.2), foram evaporados em rotaevaporador a 40°C, sendo o extrato em pó resuspendido em 5 mL de solução de Metanol e MTBE 1:1 (v/v), filtrado em filtro de membrana 0,45 µm e armazenado em vials âmbar a -20°C.

A análise cromatográfica seguiu o método descrito por Giuffrida et al. (2014), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Modelo HPLC 20AB); Forno CTO-20A (26°C) e amostrador automático: SIL-20AC. A coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex C18 de 250 x 4.6 mm, 5 µm de espessura. Fase móvel A = 81:15:4 (MeOH:MTBE:H<sub>2</sub>O) e B = 10:88:2 (MeOH:MTBE:H<sub>2</sub>O); Fluxo da fase móvel 1,0 mL min.<sup>-1</sup>; Sistema gradiente de 100% de A até 100% de B, com tempo total de corrida de 97 min. A eluição foi detectada utilizando detector de arranjo de diodos (Shimadzu) com comprimento de onda ajustado para 450 nm, porém com varredura de 400 a 800 nm. A identificação dos

carotenoides foi feita comparando-se os tempos de retenção obtidos nos padrões e nas amostras, ambos analisados sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando o detector de arranjos de diodos. A quantificação foi realizada por padronização externa com soluções-padrão de diferentes concentrações de  $\beta$ -caroteno.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa Statistica 12 (versão Statsoft, Tulsa, E.U.A.).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A caracterização físico-química da pimenta de cheiro in natura madura, liofilizada madura e in natura verde estão apresentadas na tabela 4, onde foi possível observar que os valores dos compostos orgânicos (carboidratos, proteínas e cinzas) foram mais elevados na amostra liofilizada, fenômeno consequente da redução da atividade de água por meio de evaporação, o que acarreta na concentração desses compostos. A liofilização tem como principal característica reduzir o teor de água livre nos alimentos, preservando, geralmente, suas características sensoriais e compostos termossensíveis, como é o caso dos carotenoides.

Os valores das análises da caracterização físico-química, como ocorrem em toda matéria-prima vegetal, apontaram altos valores de umidade e carboidratos, enquanto que os índices de proteína e minerais foram baixos, quando comparados com matérias-primas de origem animal.

Tabela 4: Composição centesimal da pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) in natura madura, liofilizada madura e in natura verde em base úmida.

| Compostos                           | Pimenta verde in natura    | Pimenta madura in natura   | Pimenta madura liofilizada |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Umidade (g/100g)</b>             | 93,591 ± 0,11 <sup>a</sup> | 92,483 ± 0,34 <sup>a</sup> | 12,266 ± 0,12 <sup>b</sup> |
| <b>Cinzas(mg/100g)</b>              | 0,434 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 0,368 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 5,663 ± 0,11 <sup>a</sup>  |
| <b>Lipídios (g/100g)</b>            | 0,367 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 0,456 ± 0,07 <sup>b</sup>  | 1,010 ± 0,05 <sup>a</sup>  |
| <b>Proteína total (g/100g)</b>      | 5,358 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 6,575 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 10,155 ± 0,03 <sup>a</sup> |
| <b>Carboidratos totais (g/100g)</b> | 0,25 ± 0,05 <sup>b</sup>   | 0,118 ± 0,04 <sup>b</sup>  | 70,906 ± 0,09 <sup>a</sup> |

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

No que se refere à analogia entre as amostras de pimenta de cheiro madura e verde, notou-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ )

para todos os constituintes. Porém, comparando os valores dos componentes dessas amostras com a amostra de pimenta de cheiro liofilizada madura, todos os componentes apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) devido à concentração dos componentes e a evaporação da água livre com o processo de liofilização. Notou-se um aumento substancial no teor de carboidratos, o que pode ser justificado pela hidrossolubilidade desse composto, que ao sofrer o processo de liofilização, a redução da atividade de água, possivelmente, concentrou os carboidratos antes solubilizados.

Ao avaliar as médias encontradas no presente trabalho (Tabela 4), verificou-se que os valores encontrados para todos os compostos analisados foram semelhantes médias aos obtidos por Farias (2013). Dambros (2014), estudando onze “acessos” de pimentas dedo de moça e *Capsicum*, encontrou valores com faixas bastante discrepantes para todos os compostos: umidade de 77,27 a 91,71%; proteínas de 0,80 a 2,32%; lipídios de 0,21 a 1,10%; cinzas de 0,57 a 1,54 mg/100 g e carboidratos de 6,28 a 18,47 %.

Oliveira (2011), estudando a composição físico-química de quatro variedades de pimenta do gênero *Capsicum* obteve valores próximos aos do presente trabalho para umidade, carboidratos e cinzas, enquanto que os percentuais de lipídios e proteínas apresentaram-se diferentes.

Buggenhout et al. (2009) enfatizaram que as características de matérias-primas vegetais dependem fortemente da genética e do grau de maturação, porém podem ser afetadas por práticas culturais como aplicações de fertilizantes e/ ou hormônios, estresse ambiental, como seca, estresse pelo frio, estresse pelo congelamento e outros.

## 5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS

No método ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazoline-6-sulfônico), pode-se medir a atividade antioxidante total em substâncias puras, em fluidos corporais e em material vegetal (ANTOLOVICH et al, 2002).

Ao analisar os resultados de quantificação da atividade antioxidante (Figura 14) a partir dos cálculos de substituição na equação da reta na curva de Trolox, obteve-se um valor de 3,69  $\mu\text{M}$  de Trolox/ g de amostra de pimenta in natura madura em base úmida, obtendo um resultado melhor do que o encontrado por Oliveira (2011), que determinou AAT entre 0,43 e 1,55  $\mu\text{M}$  de Trolox/ g de amostra de pimentas do gênero *Capsicum*.

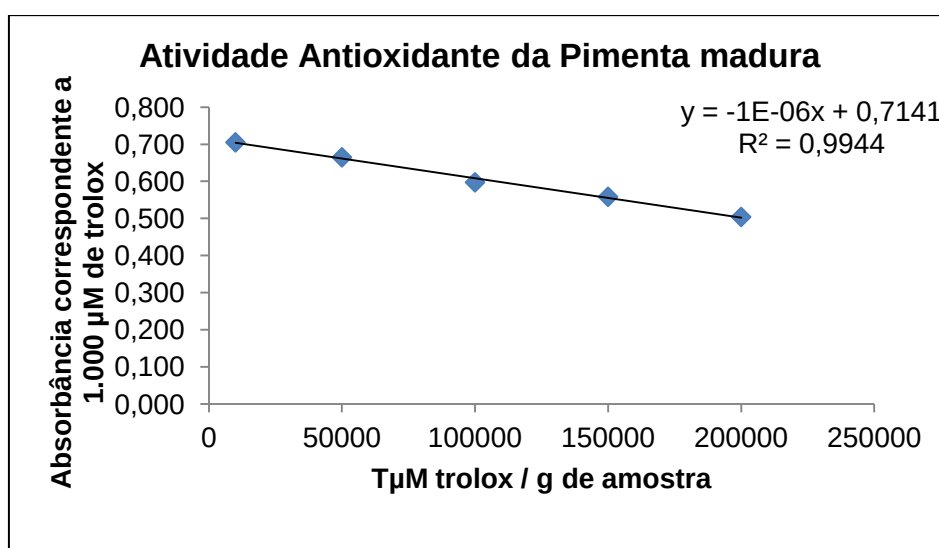


Figura 14: Comportamento reacional do Radical Trolox com extrato de Pimenta Madura

A figura 15 mostra a atividade antioxidante da amostra de pimenta in natura verde. A partir do comportamento reacional e dos cálculos, obteve-se um valor de 4,51  $\mu\text{M}$  trolox / g de amostra, maior do que o valor de AAT da amostra de pimenta in natura madura e dos valores encontrados por Oliveira (2011).

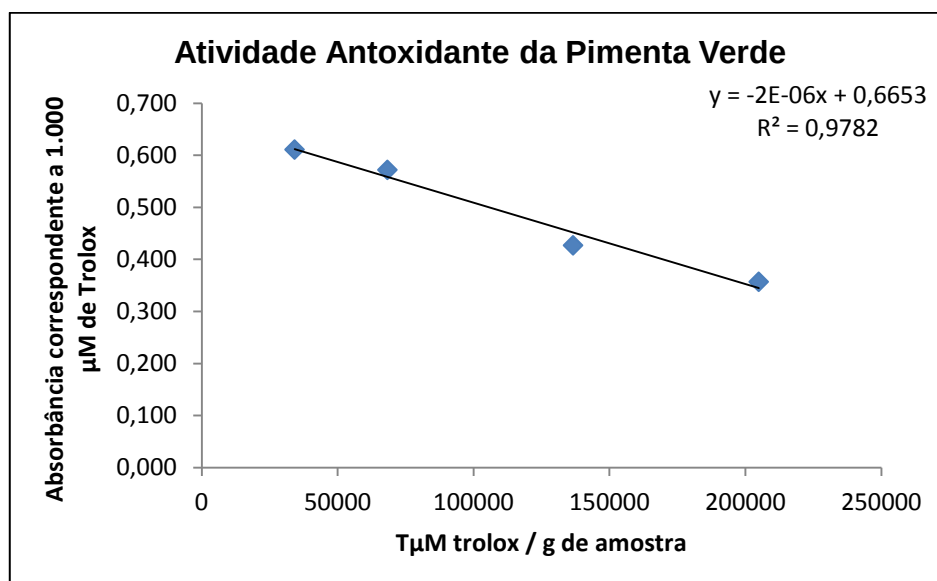


Figura 15: Comportamento reacional do Radical Trolox com extrato de Pimenta Verde

De acordo com Moraes e Colla (2006), carotenoides com pigmentação amarela, laranja ou vermelha, encontrados em diversos alimentos (tomate, abóbora, pimentão, laranja), são precursores da vitamina A e do licopeno, os quais parecem possuir ação protetora contra o câncer, além da vitamina E, principal vitamina antioxidante transportada na corrente sanguínea e da vitamina C (ácido ascórbico), consumida em grandes doses pelos seres humanos e adicionada a muitos produtos alimentícios com a finalidade de inibir a formação de metabólitos nitrosos carcinogênicos.

Guil-Guerrero (2006), afirmaram que pimentas, de um modo geral, são constituídas de nutrientes importantes para a dieta humana, por exemplo, excelente fonte de vitaminas A e C bem como de compostos fenólicos.

Oliveira (2011) relatou que os níveis desses compostos (antioxidantes) podem variar de acordo com o genótipo e maturação e são influenciados pelas condições de crescimento e perdas após o processamento, o que poderia justificar a diferença entre as atividades antioxidantes entre as pimentas estudadas no presente trabalho.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

#### 5.3.1 Quantificação de CT- Amostra in natura

Carotenoides são os principais pigmentos encontrados em pimentas do gênero *Capsicum*, sendo assim, os maiores responsáveis pela diversidade de suas colorações que variam do verde, amarelo, marrom ao vermelho (DELI et al., 2001).

No presente trabalho, da amostra de pimenta in natura madura, obteve-se um valor de CT= 9,758 µg/g de β-caroteno (base úmida), que correspondem a 129,81 µg/g de β-caroteno (base seca). Esses valores ficaram dentro dos limites encontrados na literatura. Contudo, considerando-se os maiores valores da literatura, podemos afirmar que o valor encontrado foi relativamente baixo. Isso pode ter ocorrido em razão da maioria dos trabalhos utilizarem amostras de pimenta com qualidade ideal de consumo, ou seja, pimentas verdes.

Dambros (2014), avaliando onze derivados de pimenta (partes do vegetal (polpa) e produtos processados (molhos, geleias e outros)), encontrou valores de carotenoides entre 6,4 µg/g e 420 µg/g de β-caroteno (base úmida), o que justifica a elevada variação de CT.

Oliveira (2011) observou variação de CT de 5,7µg/g para pimenta de cheiro ardida e 34 µg/g para pimenta malagueta (base úmida). Ainda para amostras de pimenta in natura, Costache et al. (2012), analisando diferentes espécies, encontraram variações entre 8,0 e 25,0 µg/g de peso fresco.

Estudando carotenoides de duas variedades de pimentas (*C. annuum* e *C. frutescens*), Nazzaro et al. (2009) constataram valores muito semelhantes entre si de 319µg/g e 335 µg/g, respectivamente, representadas em peso seco.

Topuz e Ozdemir (2007), avaliando carotenoides de seis cultivares de pimentas da Turquia, identificaram valores de CT de 124 µg/g a 6950 µg/g de massa seca da amostra. Zhuang et al. (2012), ao quantificar CT de nove cultivares de pimenta da Yunnan, uma província chinesa, obtiveram valores entre 85,2 µg/g e 1414 µg/g.



## 5.4 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

### 5.4.1 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) por solventes

A quantidade de CT extraídos pelo método convencional por solventes, que utilizou Etanol (Figura 16) e Hexano (Figura 17), estão expostos nas tabelas 5 e 6, expressos em zeaxantina e  $\beta$ -caroteno (em base seca), respectivamente.



Figura 16: Extração via Solventes utilizando Etanol



Figura 17: Extração via Solventes utilizando Hexano

Tabela 5: Valores de carotenoides extraídos por Solventes da amostra de pimenta de cheiro in natura madura, expressos em  $\mu\text{g/g}$  de Zeaxantina (em base seca).

| Tempo de extração (h) | Quantidade de CT em Zeaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) |                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------|----------------------|
|                       | Extração por Etanol                                | Extração por Hexano  |
| 2                     | 5,5295 <sup>c</sup>                                | 10,16 <sup>b</sup>   |
| 4                     | 6,7124 <sup>b</sup>                                | 9,7306 <sup>b</sup>  |
| 6                     | 12,466 <sup>a</sup>                                | 11,9821 <sup>a</sup> |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Tabela 6: Valores de carotenoides extraídos por Solventes da amostra de pimenta de cheiro in natura madura, expressos em  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno (em base seca).

| Tempo de extração (h) | Quantidade de CT em $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ ) |                      |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|
|                       | Extração por Etanol                                       | Extração por Hexano  |
| 2                     | 6,6248 <sup>c</sup>                                       | 9,3206 <sup>c</sup>  |
| 4                     | 8,2182 <sup>b</sup>                                       | 11,7735 <sup>b</sup> |
| 6                     | 13,3878 <sup>a</sup>                                      | 13,5367 <sup>a</sup> |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Analisando os valores de Zeaxantina e  $\beta$ -caroteno, obtidos nesse método, observou-se que, para ambos os carotenoides, houve um aumento significativo com o aumento do tempo de extração. Em relação ao tipo de solvente, o Hexano mostrou-se mais eficiente para os tempos de extração de 2 e 4 h, porém, não apresentou diferença com 6 h de extração. A tendência de extração mais rápida do hexano pode ser justificada pelo fato desse solvente ter a mesma polaridade dos solutos extraídos, ambos compostos são apolares ocorrendo assim maior interação entre eles quando comparado com o etanol, solvente polar.

Os valores de CT obtidos nos extratos revelaram que uma pequena parte dos CT existentes na pimenta in natura madura foi extraída pelos solventes, porém, as diferentes rotas que a amostra submetida à extração atravessou e as modificações que foram realizadas na metodologia para determinação dos CT dos extratos, provavelmente influenciaram na discrepância dos resultados.

Os valores de CT extraídos por solventes do presente trabalho apresentaram valores menores quando comparados com os valores encontrados na literatura, provavelmente devido à diferença na maturação das amostras e a metodologia usada.

Nogueira (2013), estudando carotenoides extraídos por soxhlet, durante 4h, verificou que a pimenta verde-padrão destacou-se, dentre outras variedades de espécies estudadas, pelo elevado teor de carotenoides totais, com 1432 µg/g de peso seco para a extração em hexano.

Bae (2012), ao extrair carotenoides de quatro cultivares diferentes de pimenta (*Capsicum spp.*) em soxhlet, utilizando hexano, obteve uma variação de 24 µg/g a 533 µg/g de CT em β-caroteno.

#### 5.4.2 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro madura (*Capsicum chinense*) por Ultrassom

As tabelas 7 e 8 apresentam os valores de CT obtidos na extração em ultrassom, expressos em Zeaxantina e  $\beta$ -caroteno (em base úmida), respectivamente.

Os valores obtidos para ambos os carotenoides apontaram o ensaio 7 (30mL de Hexano + 20mL de etanol) como o que apresentou maior teor de CT extraído. É importante destacar que, apesar do Hexano ter a mesma polaridade dos solutos a serem extraídos, a ação sinérgica do hexano com o etanol mostrou-se mais eficiente do que a atuação do hexano isolado, pois o ensaio 11 (50mL de Hexano) apresentou um teor de CT significativamente menor, quando comparado aos demais.

Tabela 7: : Valores de carotenoides extraídos por Ultrassom, expresso em  $\mu\text{g/g}$  Zeaxantina (em base úmida) .

| Ensaio | Quantidade de CT em Zeaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------|----------------------------------------------------|
| 1      | 9,7015 <sup>d</sup>                                |
| 2      | 8,9297 <sup>e</sup>                                |
| 3      | 8,6541 <sup>e</sup>                                |
| 4      | 10,7383 <sup>c</sup>                               |
| 5      | 9,5843 <sup>d</sup>                                |
| 6      | 10,1971 <sup>b</sup>                               |
| 7      | 12,4836 <sup>a</sup>                               |
| 8      | 8,6239 <sup>e</sup>                                |
| 9      | 4,0546 <sup>f</sup>                                |
| 10     | 2,2983 <sup>g</sup>                                |
| 11     | 4,0763 <sup>f</sup>                                |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Os resultados de CT obtidos nesse método foram semelhantes aos encontrados na extração por solventes e, da mesma forma, as rotas e as mesmas mudanças na metodologia, provavelmente influenciaram nos resultados. Como também já foi mencionado, a diferença no estágio de maturação e a metodologia podem justificar a variação dos valores comparados com os encontrados na literatura.

Biehler et al. (2012) estudando extração em ultrassom, encontraram em extratos de pimentão *Capsicum annuum* laranjas, valores de CT = 42  $\mu\text{g/g}$ , expresso em zeaxantina.

Barbero et al. (2008), ao extrair capsaicinoides de pimenta *Capsicum frutescens* L. em ultrassom estudaram fatores que influenciam no percentual de extração, dentre eles: tipo de solvente (etanol, acetonitrila, etanol e água), temperatura de extração (10, 20, 30, 40, 50 e 60°C), tempo de extração (2, 5, 10, 15, 20 e 25min), peso de amostra (0,2 a 2g) e volume de solvente (15, 25, 40 e 50mL). Esse estudo indica a necessidade de testes mais detalhados para melhores conclusões referentes aos carotenoides de pimenta de cheiro extraídos por ultrassom.

Tabela 8: Valores de carotenoides extraídos por Ultrassom, expresso em µg/g β-caroteno (em base úmida).

| Ensaio | Quantidade de CT em β-caroteno (µg/g) |
|--------|---------------------------------------|
| 1      | 8,5616 <sup>f</sup>                   |
| 2      | 8,6607 <sup>e,f</sup>                 |
| 3      | 7,1333 <sup>g</sup>                   |
| 4      | 10,5246 <sup>b</sup>                  |
| 5      | 9,0583 <sup>d</sup>                   |
| 6      | 10,16651 <sup>c</sup>                 |
| 7      | 12,4102 <sup>a</sup>                  |
| 8      | 8,9005 <sup>d,e</sup>                 |
| 9      | 3,6195 <sup>h</sup>                   |
| 10     | 2,8431 <sup>i</sup>                   |
| 11     | 2,9846 <sup>i</sup>                   |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

### 5.4.3 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) por Maceração Enzimática

Na tabela 9 estão dispostos os valores das atividades enzimáticas das preparações testadas nesse método de extração.

Tabela 9: Caracterização das atividades enzimáticas das preparações enzimáticas comerciais<sup>1</sup>.

| Quantidade (U/mL)           | Preparações Enzimáticas      |                             |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                             | Viscozyme L                  | Celluclast 1,5 L            |
| <b>Poligalacturonase</b>    | 293,83 ± 136,14 <sup>a</sup> | ND                          |
| <b>Pectinametilesterase</b> | 1152,28 ± 1,27 <sup>a</sup>  | 808,36 ± 47,92 <sup>c</sup> |
| <b>Pectinaliase</b>         | 4,11 ± 11,80 <sup>a</sup>    | 5,02 ± 4,82 <sup>a</sup>    |
| <b>Xilanase</b>             | 170,07 ± 16,48 <sup>b</sup>  | 407,95 ± 4,03 <sup>a</sup>  |
| <b>Invertase</b>            | 64,42 ± 4,70 <sup>a</sup>    | 0,23 ± 0,14 <sup>c</sup>    |
| <b>Celulase</b>             | 6,80 ± 2,15 <sup>b</sup>     | 15,34 ± 3,15 <sup>a</sup>   |
| <b>Amilase</b>              | 171,55 ± 2,64 <sup>a</sup>   | 1,36 ± 0,67 <sup>c</sup>    |

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 10%. ND = Não detectada.

Os dados expostos na tabela acima confirmam os estudos de Farias (2013), bem como justificam a escolha dessas preparações enzimáticas, analisando a composição das mesmas e da matéria-prima estudada.

#### 5.4.3.1 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) via Maceração Enzimática - Escala de Bancada

##### a) Experimento I: Maceração Enzimática com Celluclast 1,5 L

Os valores de CT, expressos em zeaxantina e  $\beta$ -caroteno, obtidos a partir do planejamento experimental fracionário  $2^{4-1}$  estão expostos nas tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10: Valores de CT extraídos por maceração enzimática, expressos em  $\mu\text{g/g}$  de Zeaxantina.

| Ensaio | Quantidade de CT em Zeaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------|----------------------------------------------------|
| 1      | $4,4291 \pm 0,006^{a,b}$                           |
| 2      | $3,2353 \pm 0,320^{c,d}$                           |
| 3      | $5,0674 \pm 0,339^a$                               |
| 4      | $2,6399 \pm 0,674^{c,d}$                           |
| 5      | $3,3716 \pm 0,264^{b,c}$                           |
| 6      | $2,077 \pm 0,406^{d,e}$                            |
| 7      | $0,9639 \pm 0,19^e$                                |
| 8      | $2,415 \pm 0,072^{c,d}$                            |
| 0      | $4,4629 \pm 0,750^a$                               |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Tabela 11: Valores de CT extraídos por maceração enzimática com Celluclast 1,5 L, expressos em  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno

| Ensaio | Quantidade de $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------|-----------------------------------------------------|
| 1      | $4,7484 \pm 0,273^a$                                |
| 2      | $3,3730 \pm 0,091^b$                                |
| 3      | $5,2187 \pm 0,034^a$                                |
| 4      | $2,5942 \pm 0,567^{b,c,d}$                          |
| 5      | $2,7864 \pm 0,218^{b,c}$                            |
| 6      | $2,4703 \pm 0,080^{c,d}$                            |
| 7      | $1,1288 \pm 0,004^e$                                |
| 8      | $1,9370 \pm 0,134^{d,e}$                            |
| 0      | $3,9971 \pm 0,380^b$                                |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

Ao observar os valores de CT das tabelas 10 e 11, notou-se que, os melhores ensaios foram 1, 3 e 0, para Zeaxantina e 1 e 3, para  $\beta$ -caroteno.

Em relação às condições dos ensaios 3 (200 RPM de agitação, 200 $\mu$ L de Celluclast, 3h de incubação e 25°C), 1 (100 RPM de agitação, 200 $\mu$ L de Celluclast, 1h de incubação e 25°C) e 0 (150 RPM de agitação, 300 $\mu$ L de Celluclast, 2h de incubação e 30°C) observou-se uma tendência de que a menor quantidade de enzima na maceração da pimenta de cheiro in natura madura obteve maiores extrações de CT.

Os diagramas de Pareto (Figura 18) revelaram que as variáveis de agitação, tempo e temperatura de incubação, nas faixas estudadas, não influenciaram significativamente ( $p > 0,10$ ) na quantidade de CT extraídos. Porém, esses diagramas revelaram que o volume de enzima influenciou significativamente ( $p < 0,10$ ), de forma negativa, na quantidade de CT extraídos, o que significa que, dentro da faixa de volume de enzima estudado, quanto menor o volume aplicado, maior será a quantidade de CT extraídos. Esse fato justifica os ensaios 7 e 8 apresentarem os menores teores de CT extraídos.

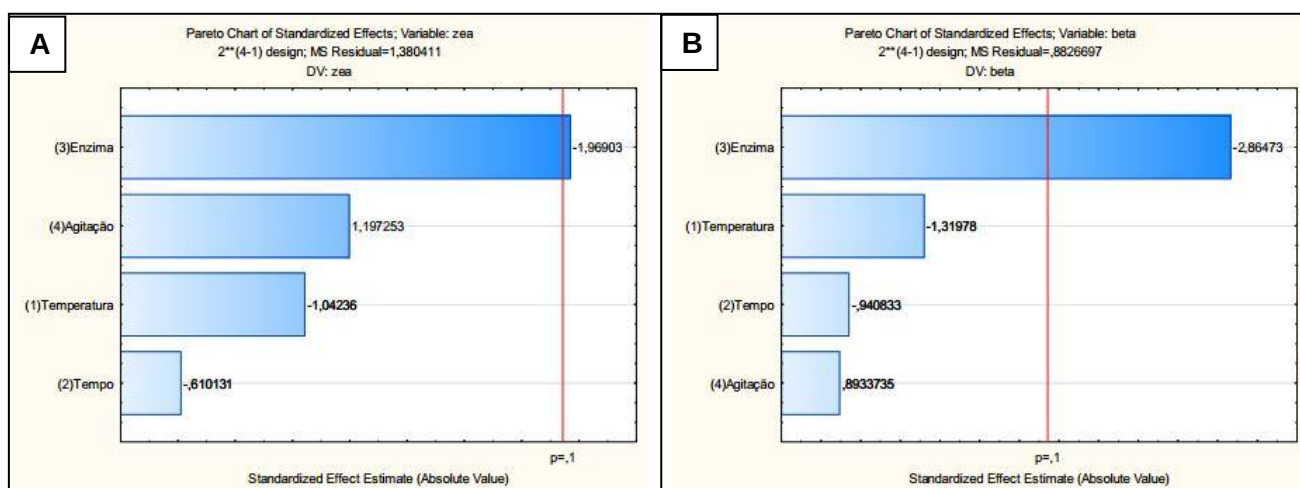


Figura 18: Diagrama de Pareto da extração de carotenoides por maceração enzimática.

A) Zeaxantina; B)  $\beta$ -caroteno.

Farias (2013) observou uma variação no teor de Zeaxantina de 2400  $\mu$ g/g em base seca na pimenta in natura e 72,46 $\mu$ g/g a 208,4 $\mu$ g/g nas fases líquidas e nos resíduos de molhos de pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.) fermentados por maceração enzimática. Avaliando o comportamento dos



CT num período de 6 semanas e testando as polpas maceradas com e sem cloreto de sódio, o autor encontrou 70,71 µg/g de zeaxantina na polpa não macerada com sal (armazenamento de 0 semanas) e 214 µg/g de zeaxantina na polpa macerada com sal (armazenamento de 5 semanas).

No que se refere à extração de carotenoides por maceração enzimática, ainda são escassos os estudos em amostras de pimentas, especialmente pimentas de cheiro maduras, objeto de estudo do presente trabalho, que são descartadas pelos consumidores, mas que podem ser aproveitadas para obtenção de carotenoides. Vieira (2013), extraíndo carotenoides de película de cajá por maceração enzimática, verificou alto teor de carotenoides (74 µg/g de extrato) nos menores volumes de preparação enzimática aplicados, reafirmando o efeito ocorrido no presente trabalho.

Diante do exposto, um segundo experimento foi realizado, buscando avaliar o efeito de uma preparação enzimática pectinolítica (Viscozyme L) em comparação com a preparação celulolítica (Celluclast 1,5 L), bem como a redução do volume de enzimas aplicadas.

b) Experimento II: Maceração Enzimática com Viscozyme L e Celluclast 1,5 L

Na tabela 12 estão apresentados os resultados da extração dos CT por meio das macerações enzimáticas realizadas com Viscozyme L e Celluclast 1,5 L (Figura 19).

Tabela 12: Valores de carotenoides extraídos por Maceração Enzimática com Viscozyme L e Celluclast 1,5 L, expressos em  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno

| Ensaio (TI/VP*) | Quantidade de $\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ ) |                            |
|-----------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|
|                 | Viscozyme L                                         | Celluclast 1,5 L           |
| 1 (1h/100ppm)   | $3,5403 \pm 0,182^{c,d}$                            | $7,0262 \pm 0,218^{a,b}$   |
| 2 (1h/200ppm)   | $3,7211 \pm 0,398^{c,d}$                            | $6,7465 \pm 0,817^{a,b,c}$ |
| 3 (1h/300ppm)   | $0,2690 \pm 0,075^e$                                | $5,1018 \pm 0,776^{c,d}$   |
| 4 (2h/100ppm)   | $6,0691 \pm 0,111^b$                                | $7,4565 \pm 0,348^a$       |
| 5 (2h/200ppm)   | $4,0173 \pm 0,029^{c,d}$                            | $5,1865 \pm 0,272^{c,d}$   |
| 6 (2h/300ppm)   | $0,7618 \pm 0,029^e$                                | $5,6185 \pm 0,520^{b,c,d}$ |
| 7 (3h/100ppm)   | $2,8939 \pm 0,529^d$                                | $7,393 \pm 0,162^a$        |
| 8 (3h/200ppm)   | $0,3372 \pm 0,066^e$                                | $7,8227 \pm 0,560^a$       |
| 9 (3h/300ppm)   | $0,1349 \pm 0,087^e$                                | $5,460 \pm 0,173^{c,d}$    |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5%.

\*TI/VP = Tempo de incubação/Volume de Preparação Enzimática de cada maceração realizada em pimenta in natura madura.

Os resultados do segundo experimento apresentaram a mesma tendência do primeiro, onde os melhores resultados foram dos ensaios que continham os menores volumes de enzima. A maceração com Viscozyme L não conseguiu atingir o mesmo nível de extração de CT em relação à maceração com Celluclast 1,5 L, com exceção do ensaio 4 (2h100ppm). O ensaio que se destacou na maceração com Celluclast 1,5 L foi o ensaio 1, pois conseguiu ficar entre os melhores ensaios (1,2,4,7 e 8) mesmo utilizando apenas 1 h de incubação e 100 ppm de Celluclast 1,5 L.

A quantidade de CT extraída por maceração enzimática revelou-se menor em relação à quantidade extraída por solventes e por ultrassom. Isso pode ter ocorrido devido às rotas diferenciadas do processo de maceração. Outra explicação pode ser a de que um carotenoide torna-se disponível após ser liberado enzimaticamente da fonte e, devido à sua solubilidade limitada em água, podem ser incorporados em gotículas lipídicas, ou associados a

outros componentes como proteína e moléculas de açúcares, como o amido (BOHN, 2008).

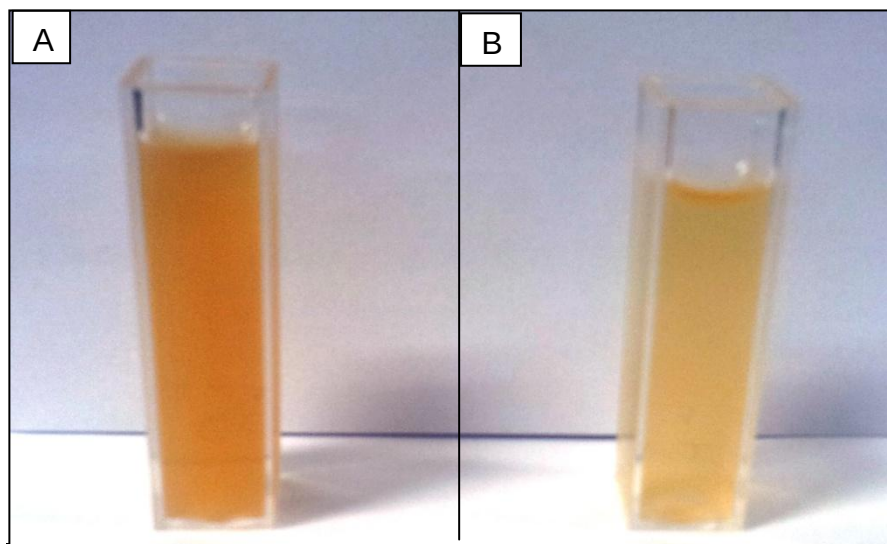


Figura 19: Extração por ME. A- Tratamento com Celluclast 1,5L; B- Tratamento com Viscozyme L.

#### 5.4.3.2 Extração de Carotenoides de pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) por ME - Escala Piloto

Utilizando o ensaio mais adequado do experimento II (ensaio com 1 h de incubação e 200 ppm de Celluclast 1,5 L), realizou-se uma maceração em escala piloto com bioreator (Figura 20). Nessa maceração, o valor de CT extraídos foi de 28,44  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -caroteno (em base úmida), apresentando a maior extração entre todos os métodos que foram avaliados no presente trabalho.

A discrepância dos resultados de CT extraídos com a ampliação da escala pode ter ocorrido devido às condições diferenciadas entre as mesmas, uma vez que a maceração em escala de bancada foi realizada em erlenmeyers, com shaker orbital para agitação e controle de temperatura, enquanto a maceração em escala piloto foi realizada em condições mais adequadas para a reação das enzimas, com equipamento bioreator, agitação interna com hélices acopladas e temperatura constante com controle por meio de termostatos.

A ampliação da escala aumentou 73,52% no teor de CT extraídos, expresso em  $\beta$ -caroteno. bEsse resultado é bastante positivo, pois a maceração enzimática é uma tecnologia limpa, que não utiliza adição de produtos químicos e pode ser aplicada ao processamento de alimentos. Uma possível justificativa dessa elevação de CT extraído está relacionada à presença de moléculas anfipáticas, isto é, que podem interagir com substâncias de diferentes polaridades, como é o caso das enzimas aqui aplicadas, como o sistema do bioreator facilitou a homogeneização da mistura, da mesma forma as preparações enzimáticas reagiram melhor do que na escala de bancada.



Figura 20: Extração por Maceração enzimática em escala piloto.

Tochi et al. (2009) afirmaram que, sob condições determinadas as antocianinas (outros compostos antioxidantes) podem ser hidrolisadas por enzimas pectinolíticas passando de azuis/vermelhas para substâncias incolores. No entanto, Farias (2013) ressaltou que, até o momento, não se encontrou na literatura relatos de que carotenoides podem ser degradados por enzimas. Assim, cabe salientar que, conforme demonstrado na maceração em escala piloto, as enzimas não apenas podem elevar o percentual de extração dos carotenoides, como melhorar a sua qualidade.

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS CAROTENOIDES

Na tabela 13 encontram-se os valores determinados na CLAE para cada extrato obtido, bem como os valores das amostras in natura madura e in natura verde. Cabe salientar que, de posse de apenas um padrão ( $\beta$ -caroteno), fez-se necessário consultar a literatura para comparar os cromatogramas na tentativa de melhor interpretar os gráficos.

Tabela 13: Resultados obtidos na CLAE

| <b>Amostra</b> | <b>TR(min)</b> | <b>Área</b> | <b>Conc (ug/mL) de <math>\beta</math>-caroteno</b> |
|----------------|----------------|-------------|----------------------------------------------------|
| EPSET          | 23,889         | 168045      | 11,80                                              |
| EPSHEX         | 23,91          | 221128      | 15,52                                              |
| EPM            | 23,93          | 24281       | 1,74                                               |
| EPIN dil (1:2) | 23,948         | 222379      | 15,61                                              |
| EPU            | 23,851         | 56704       | 4,01                                               |
| EPMBio         | 23,843         | 93761       | 6,60                                               |
| EPV            | 23,46          | 270837      | 19,00                                              |

EPSET- Extrato de Pimenta obtido em Soxhlet com Etanol; EPSHEX- Extrato de Pimenta obtido em Soxhlet com Hexano; EPM- Extrato de Pimenta Macerada em bancada; EPIN dil (1:2)- Pimenta madura in natura; EPU- Extrato de Pimenta obtido em Ultrassom; EPMBio-- Extrato de Pimenta Macerada em Escala Piloto; EPV- Pimenta verde in natura.

Collera-Zuniga et al. (2005) listaram os principais carotenoides e seus respectivos tempos de retenção (Tabela 15), dos quais pode-se fazer uma analogia com os tempos de retenção dos maiores picos obtidos nos extratos do presente trabalho (Tabela 14). Comparando ambas as tabelas, pode-se sugerir que, os picos aqui encontrados, provavelmente seriam: Pico 1- não identificado; Pico 2- Capsantina; Pico3- Luteína; Pico 4- Zeaxantina; Pico 5- Criptocapsina; Pico 6- Criptoxantina; Pico 7-  $\beta$ -Caroteno; Pico 8- não identificado. Vale ressaltar, no entanto, que maiores informações seriam necessárias para confirmar a equivalência desses compostos, tais como área de pico e concentração, mesmo que expressa em ug/mL de  $\beta$ -caroteno.

Os cromatogramas das amostras analisadas neste trabalho estão dispostos nas figuras de 21 a 28. Na figura 28, Filho 2010, ao analisar em CLAE acoplada a espectrofotometria de massas de quatro espécies do gênero *Capsicum* L. identificou, para *Capsicum Chinense* 7 picos, listados na tabela 16.

Tabela 14: Picos encontrados na CLAE (TR-min)

| Método        | Pico 1 | Pico 2 | Pico 3 | Pico 4 | Pico 5 | Pico 6 | Pico 7 | Pico 8 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>PINm</b>   | ---    | ---    | 23,89  | ---    | 31,26  | 33,68  | 35,95  | ---    |
| <b>PINv</b>   | 11,74  | 17,75  | 23,46  | ---    | ---    | ---    | ---    | ---    |
| <b>EPSet</b>  | ---    | 18,59  | 23,89  | ---    | 31,26  | 33,68  | 35,96  | ---    |
| <b>EPShex</b> | ---    | ---    | 23,91  | ---    | 31,27  | 33,69  | 35,98  | 38,10  |
| <b>EPU</b>    | 12,58  | ---    | 23,85  | 28,68  | 31,22  | 33,65  | 35,95  | ---    |
| <b>EPM</b>    | ---    | ---    | ---    | ---    | 31,31  | 33,72  | 35,99  | ---    |
| <b>EPbio</b>  | ---    | ---    | ---    | ---    | 31,21  | 33,62  | 35,92  | ---    |

PINm- Pimenta in natura madura; PINv- Pimenta in natura verde; PSet- Extrato de Pimenta obtido em Soxhlet com Etanol; EPShex- Extrato de Pimenta obtido em Soxhlet com Hexano; EPU- Extrato de Pimenta obtido em Ultrassom; EPM- Extrato de Pimenta Macerada em bancada; EPMBio- Extrato de Pimenta Macerada em bioreator;

Tabela 15: Carotenoides e seus respectivos TR (min)\*

| Carotenoide                | Tempo de Retenção (min) |
|----------------------------|-------------------------|
| Latoxantina                | 9.7                     |
| Capsorubina                | 11.4                    |
| Neoxantina                 | 13.1                    |
| Capsantina 5,6-epoxi       | 13.25                   |
| Violaxantina               | 14.4                    |
| Capsantina 3,6- epoxi      | 15.3                    |
| Luteoxantina               | 16.1                    |
| Curcubitaxantina           | 17.3                    |
| Capsantina                 | 17.8                    |
| Cicloviolaxantina          | 19.3                    |
| Anteraxatina               | 19.3                    |
| Mutatoxantina              | 20,9                    |
| Mutatoxantina              | 21.9                    |
| 9-cis-Capsanthina          | 23.0                    |
| Luteina                    | 24.0                    |
| Zeaxantina                 | 24.3                    |
| 9-cis-zeaxanthin           | 27.2                    |
| 15-cis-zeaxanthin          | 28.4                    |
| Cantaxantina               | 29.6                    |
| Criptocapsina              | 31.5                    |
| $\alpha$ -Criptoxantina    | 33.9                    |
| $\beta$ -Criptoxantina     | 34.4                    |
| $\beta$ - apo-8-0 Caroteno | 34.9                    |
| $\alpha$ - caroteno        | 40.4                    |
| $\beta$ - caroteno         | 40.8                    |

\*Collera-Zuniga et al. (2005)

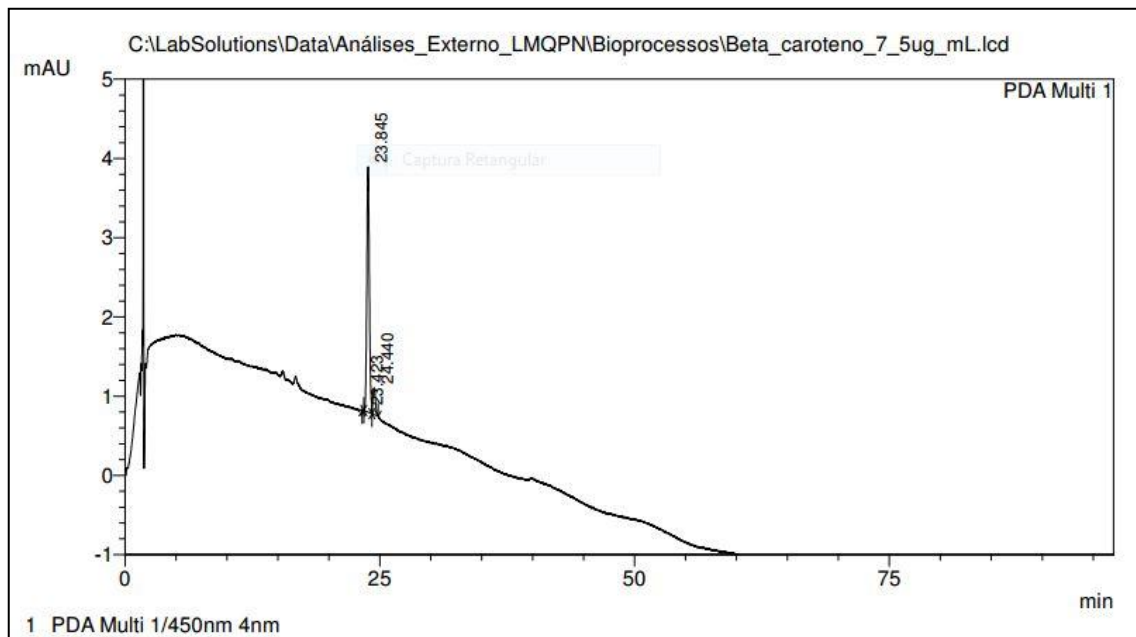
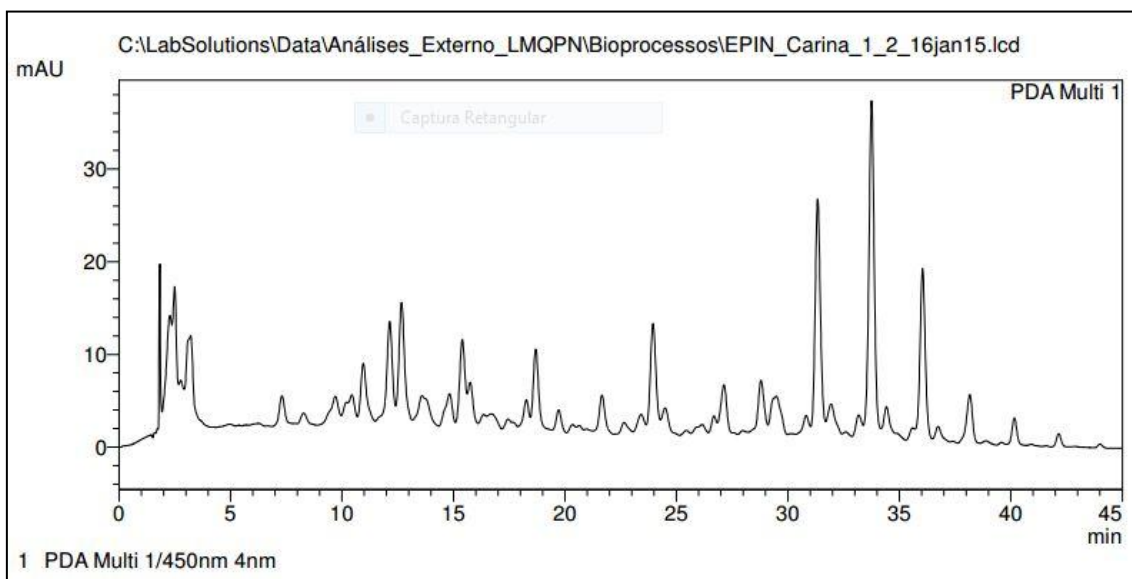
Figura 21: Cromatograma do padrão de  $\beta$ -caroteno

Figura 22: Cromatograma da amostra de pimenta in natura madura (diluição 1: 2)

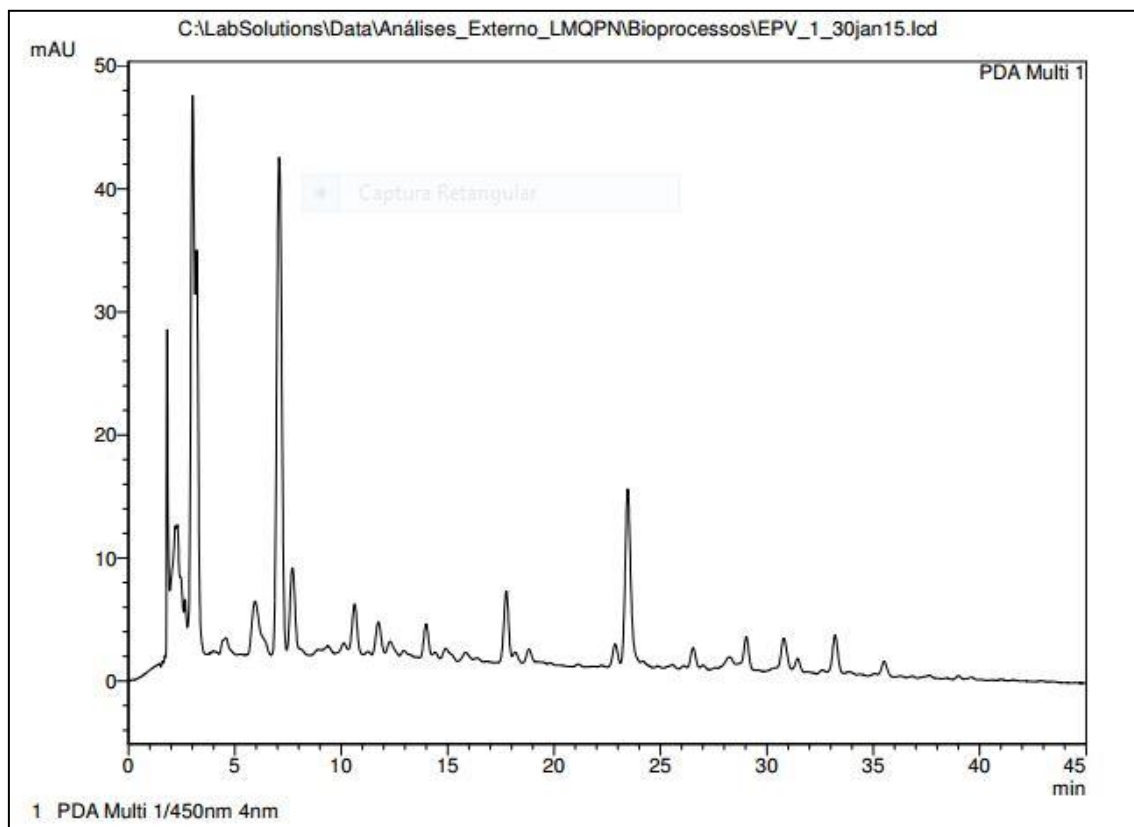


Figura 23: Cromatograma da amostra de pimenta in natura verde

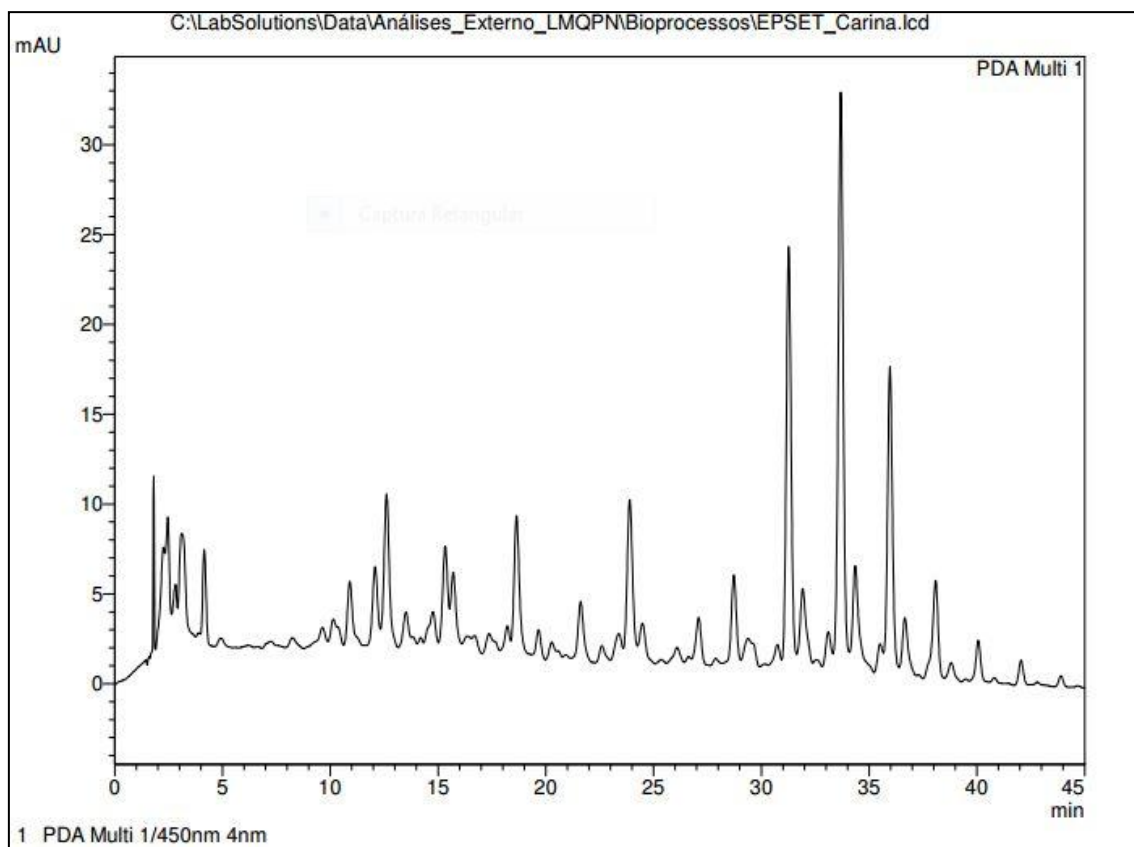


Figura 24: Cromatograma do extrato obtido em Soxhlet com Etanol



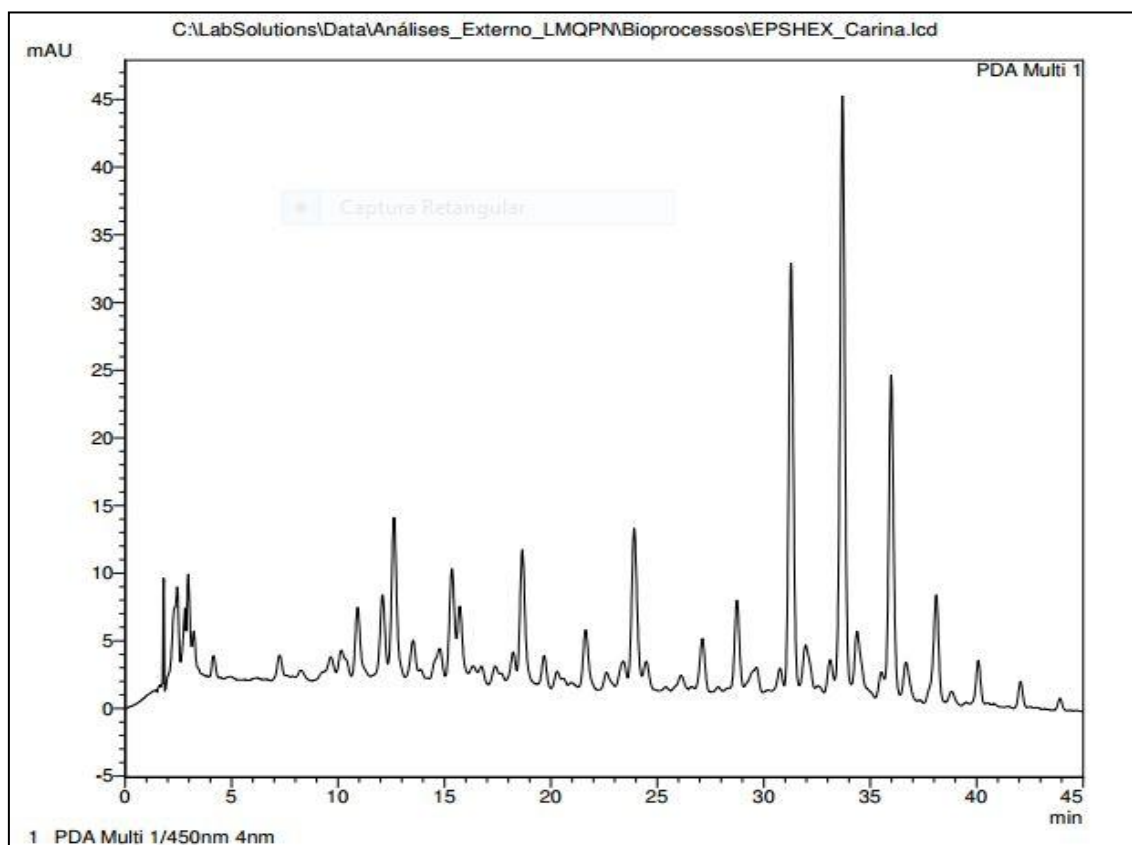


Figura 25: Cromatograma do extrato obtido em Soxhlet com Hexano

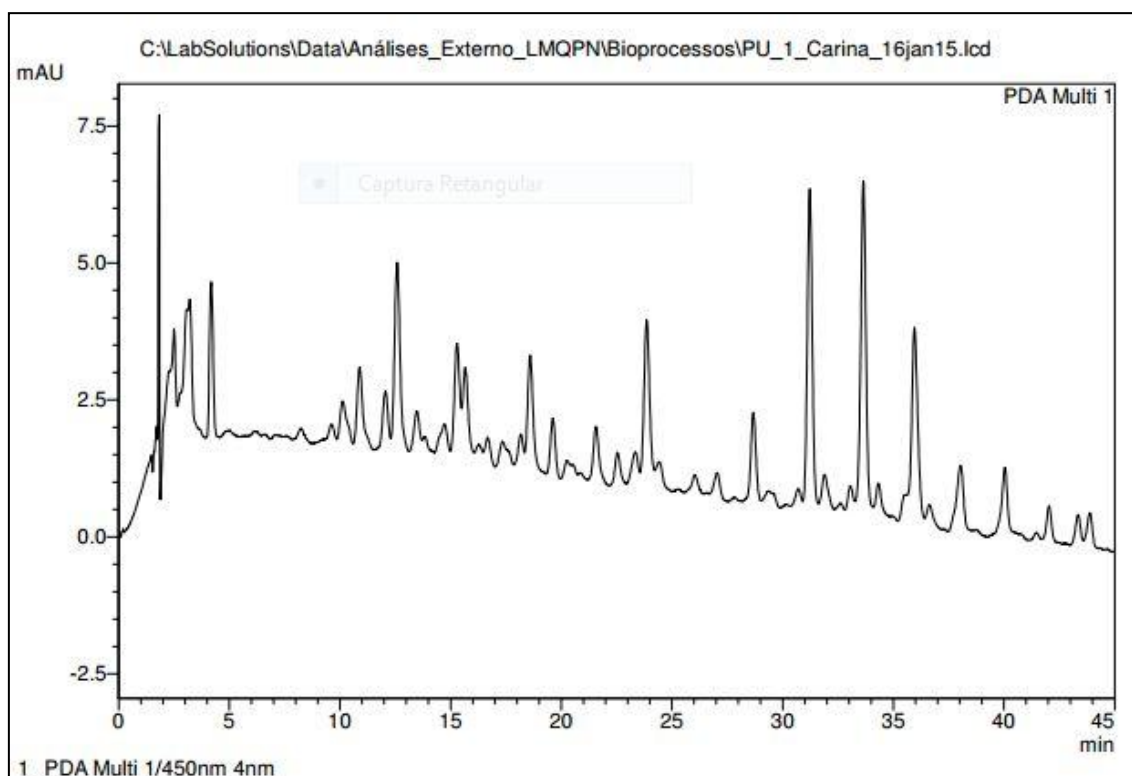


Figura 26: Cromatograma do extrato obtido em Ultrassom (ensaio 7)

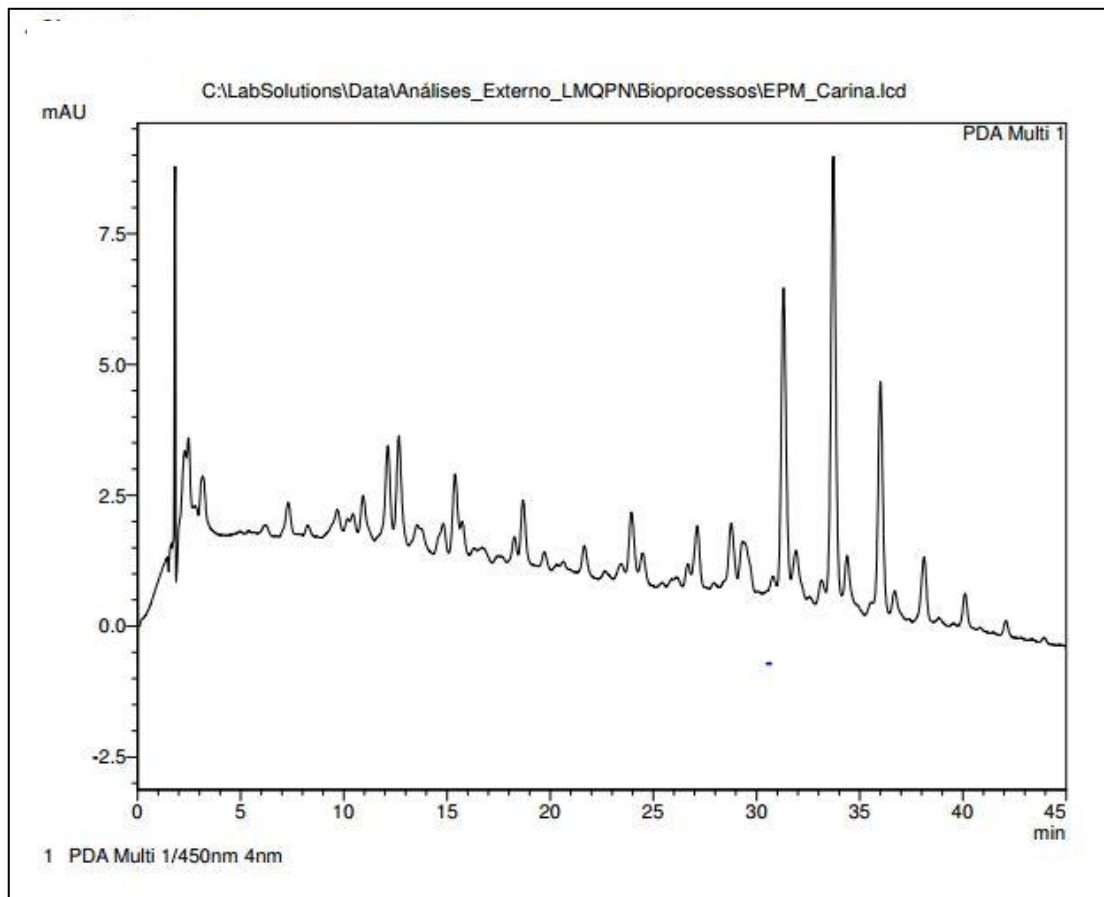


Figura 27: Cromatograma do Extrato de ME em escala de bancada

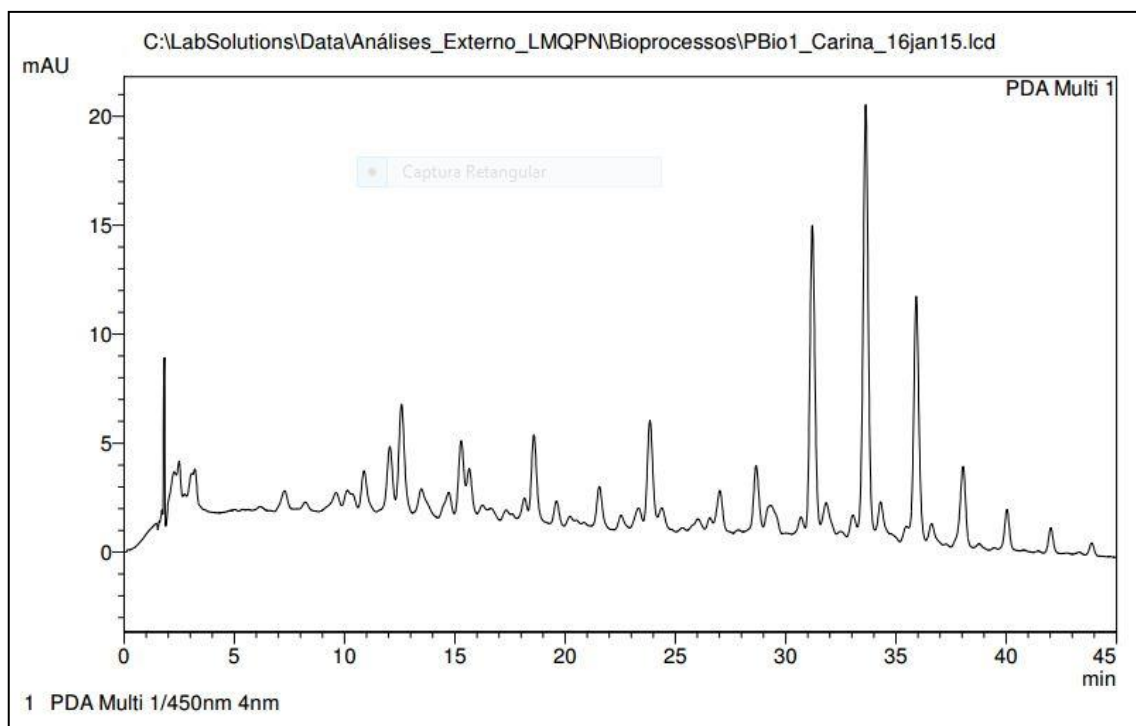


Figura 28: Cromatograma do extrato obtido por Maceração enzimática em escala piloto

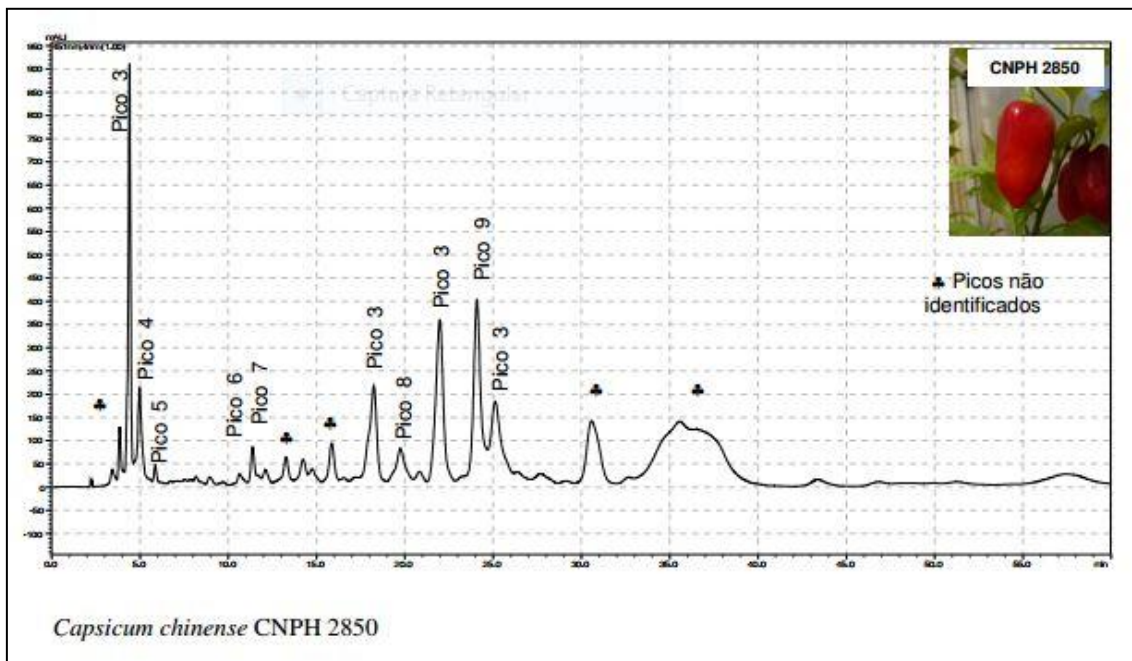


Figura 29: Cromatograma de *Capsicum chinense* (FILHO, 2010)

Tabela 16: Picos de *Capsicum chinense* identificados por LCMS (FILHO, 2010)

| PICOS | CAROTENOIDE             |
|-------|-------------------------|
| 3     | Capsantina              |
| 4     | Luteína                 |
| 5     | Zeaxantina              |
| 6     | $\alpha$ -criptoxantina |
| 7     | $\beta$ -criptoxantina  |
| 8     | $\alpha$ -caroteno      |
| 9     | $\beta$ -caroteno       |

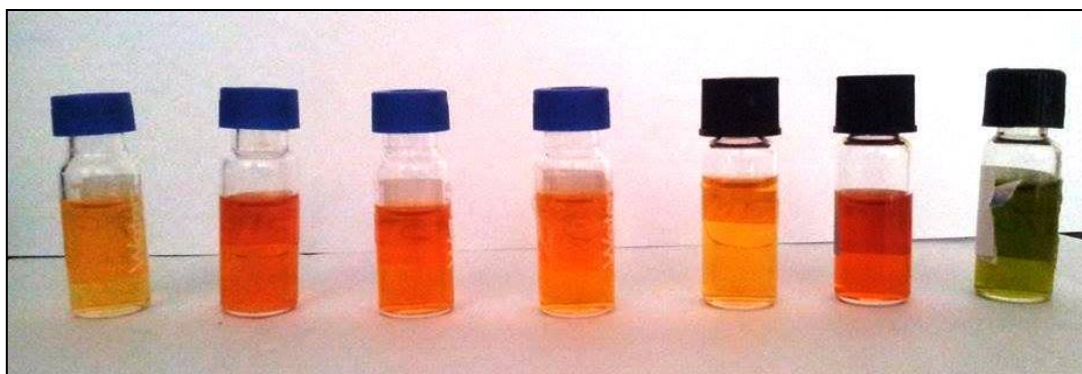


Figura 30: Extratos para CLAE. Da esquerda pra direita: Extrato obtido por Ultrassom; Extrato obtido em Soxhlet com Hexano; Extrato obtido em Soxhlet com Etanol; Extrato obtido por ME em escala piloto; Extrato obtido por ME em escala de bancada; Pimenta in natura madura e Pimenta in natura verde.

## 6 CONCLUSÃO

A pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*) in natura madura, considerada como produto inviável para consumo, contém capacidade antioxidante e quantidades consideráveis de carotenoides, que podem ser extraídos e aproveitados para diversos fins.

De acordo com a avaliação dos métodos de extração de carotenoides da pimenta de cheiro in natura madura, estudados no presente trabalho, podemos concluir que os métodos mais eficientes foram, a maceração enzimática em escala de planta piloto, utilizando 200 ppm de Celluclast 1,5 L em 1 h de incubação, provavelmente, em razão das condições controladas do bioreator, que possibilitaram a quebra da parede celular dos tecidos da pimenta, rica em celulose, liberando com mais eficácia os carotenoides. O outro método que apresentou resultados satisfatórios foi o método de extração por solventes, utilizando hexano por 6 h em soxhlet, provavelmente, devido à idêntica polaridade do solvente e do soluto.

Levando em consideração os resultados obtidos nas análises e o avanço da biotecnologia na indústria de alimentos, que vem substituindo processos tradicionais devido às vantagens como ação específica e perspectivas em evitar prejuízos ao meio ambiente. Assim, podemos apontar o método de extração de carotenoides de pimenta in natura madura por maceração enzimática em escala piloto como o mais adequado, dentre os estudados.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-PARRILLA, E., DE LA ROSA, L. A., AMAROWICZ, R., and SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serra no peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 163–173; 2010.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MACDONALD, S., ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **J. Royal Soc. Chem.**, v. 127, p. 183-198, 2002.
- AKHTAR, M. H.; BRYAN, M. Extraction and quantification of major carotenoids in processed foods and supplements by liquid chromatography. **Food Chemistry**. v.111, p. 255–261, 2008.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113, 2007.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18. ed., Washington, 2011.
- AQUINO, ANDREA CARDOSO DE. Estudo da Ampliação da Escala na Produção de Néctar de Bacuri (*Platonia insignis Martius*) com Aplicação de Preparações Enzimáticas Comerciais. **Tese de Doutorado**, Fortaleza, Ce, 2012.
- AZIZAH, A. H.; RUSLA WATTI, N. M.; TEE, T. S. Extraction and characterization of antioxidant from coco a by-products. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 199-202, 1999.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M. ; MOHAMED, A.; F. SAHENA; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117, 426- 436, 2013.
- BAE, Haejin.; Jayaprakasha, G.K.; Jifon, John.; Patil, Bhimanagouda S. Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum spp.*) cultivars. **Food Chemistry** v.134, p.1912–1918, 2012.
- BARBERO, G. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. **Talanta** v. 75, p.1332-1337, 2008.
- BARREIROS, A. L.; 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.

BEATTY S.; BOULTON M.; HENSON D.; KOH H. H.; MURRAY I. J. Macular pigment and age related macular degeneration. **British Journal of Ophthalmology**. Jul; 83 (7): 867-877, 1999.

BIEHLER, ERIC; ALKERWI, APA'A; HOFFMAN, LUCIEN; KRAUSE, ELMAR; GUILLAUME, MICHELE; LAIR, MARIE-LISE; BOHN, TORSTEN. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 25, p. 56-65, 2012.

BOHN, T. Bioavailability of Non-Provitamin A Carotenoids. **Current Nutrition & Food Science**, n.4, p. 240-258, 2008.

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios**. São Paulo: Alaúde, 2007.

BRACHT, A; ISHII-IWAMOTO, E. L. Métodos de Laboratório em Bioquímica. São Paulo: **Manole**, 2007.

BRASIL, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 53, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014 (Publicada no Diário Oficial da União nº 194 - Brasília-DF, quarta-feira, 08 de outubro de 2014). Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e156580045c8232da081e2d10ee53f37/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n.53\\_2014\\_Lista+de+enzimas.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e156580045c8232da081e2d10ee53f37/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n.53_2014_Lista+de+enzimas.pdf?M OD=AJPERES), acesso em: 12 de janeiro de 2015.

BUGGENHOUT, S. V.; SILA, D. N.; DUVETTER, T.; LOEY, A. V.; HENDRINCKX, M. Pectins in Processed Fruits and Vegetables Part III- Texture Engineering. Comprehensive Reviews in **Food Science and Food Safety**, v. 8, p 105-117, 2009.

CAI, JINXING; LIU, XIUFENG; LI ZHAOMENG AN CUIPING Study on Extraction Technology of Strawberry Pigments' and Its Physicochemical Properties; **Food and Fermentation Industries**, 29, 69-73, 2003-05.

CHEN, FENG.; LI, HUA-BIN.; WONG, RICKY NGOK-SHUN.; JI, BO.; JIANG, YUE. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1064, 183- 186, 2005.

COLLERA-ZUNIGA OFELIA; JIMENEZ, FEDERICO GARCIA; GORDILLO, RICARDO MELENDEZ Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. **Food Chemistry** 90, 109–114, 2005.

COSTACHE, M.A., CAMPEANU, G. & NEATA, G. Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, 5; p. 7703-7708, 2012.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) – Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 1993.

DAMBROS, JULIELE ILONE. **Estabilidade de Compostos Potencialmente Bioativos e Alterações de Qualidade em Frutos e Produtos de Pimenta (*Capsicum spp.*)** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2014.

DELI, J.; MOLNÁR, P.; MATUS, Z.; TÓTH, 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.

DONALD G. Pepper and Capsaicin (*Capsicum* and a Piper Species). **Barceloux, MD**, p.380-390, 2009.

EMBRAPA HORTALIÇAS. *Capsicum*: Pimentas e Pimentões do Brasil, 2009. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/index.htm>>. Acesso em: 21.12.2013.

FARIAS, Virna Luiza de. **Aumento do Rendimento do Extrato de Pimenta (*Capsicum Frutescens L.*): Utilização de Preparações Enzimáticas Comerciais**- Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, UFC, Fortaleza, 2013.

FILHO, JOSÉ GETÚLIO DA SILVA. Diversidade dos pigmentos e do Gene Codificador de Capsantina-Capsorubina sintase (via biossintético de carotenoides) em quatro espécies do gênero *Capsicum L.* Dissertação (Mestrado). UNB, Brasília, 2010.

GODOY, H. T. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis isomers of provitamin A in Brazilian Fruits. **Journal Agricultural Food Chemitry**; v. 42 p. 1306-1313; 1994.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 36: 701-707, 1992.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794-802, 2013.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Evaluation of carotenoids contents in powder of red

chili peppers during one year of storage. *Food Research International*. v.65, p.163-170, 2014.

GUIL-GUERRERO, J. L., MARTINEZ-GUIRADO, C., REBOLLOSO-FUENTES, CARRIQUE-PÉREZ, A. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper. **Eur.Food Res. Technol**, n. 224, p. 1-9, 2006.

GUZMAN, I.; HAMBY, S.; ROMERO, J.; BOSLAND, P. W.; O'CONNEL, M. A. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum spp.* **Plant Science**, v. 179, p. 49-59, 2010.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E.; Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, London, v.92, n. 2, p. 193-202, 2005.

KHANNA, P. K.; SETHI, R. P.; TEWARI, H. K. Production poligalacturonase and pectin methyl esterase by *Aspergillus niger* C1. **Journal of Research. Punjab Agricultural University**, v. 18, n. 4, p. 415-420, 1981.

KIM, G. D., LEE, Y. S., CHO, J.-Y., LEE, Y. H., CHOI, K. J., LEE, Y., et al. Comparison of the content of bioactive substances and the inhibitory effects against rat plasma oxidation of conventional and organic hot peppers (*Capsicum annum L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 12300–12306, 2010.

LAMBROPOULOU, D.A.; KONSTANTINOOU, I.K.; ALBANIS, T.A. **J. Chromatogr. A** 1124, 97, 2006.

LANNES, S.D. et al. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v.112, p.266-270, 2007. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/scihorti>>. Acesso em: 03/08/2014.

LAROZE, L.; SOTO, C.; ZÚÑIGA, M.E. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. **Electron. J. Biotechnol.** 13, 1–11; 2010.

LEE, M.H.; LIN, C.C. Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*: Ultrasonic and pressurized solvent extractions. **Food Chemistry**; 105, 223–228; 2007.

LIN, J.-Y.; TANG, C.-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, 101, 140-147, 2007.

LOZIENE, K., VENSKUTONIS, P.R., SIPAILIENE, A., LABOKAS, J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. **Food Chemistry**, 103, 546-559, 2007.



LUO, X.-J.; PENG, J.; LI, Y.-J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, vol. 650 p. 1–7, 2011.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, p. 77-84, 2005.

MARÍN, A.; FERRERES, F.; TOMAÁS-BARBERAÁN, 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.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M .J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch. Latin. de Nutr.** Caracas, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L.L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente conhecidas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas; V. 26; nº3; p. 639-644, 2006.

MITROWSKA, KAMILA.; VINCENT, URSULA.; HOLST, CHRISTOPH VON. Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach. **Journal of Chromatography A**, 1233, 44–53, 2012.

MOHDALY, A.A.A., SARHAN, M.A., MAHMOUD, A., RAMADAN, M.F., SMETANSKA I., “Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection”, **Food Chemistry**, 123, pp.1019–1026, 2010.

MORAES, F. P., COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev. Eletr. Farm.** V. 3(2), p. 109-122, 2006.

MOURA, C. L. A. **Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos**. In: MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 18 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 108), 2007.

NAZZARO, F., CALIENDO, G., ARNESI, G., VERONESI, A., SARZI, P. & FRATIANNI, F. Comparative content of some bioactive compounds in two varieties of *Capsicum annuum* L. sweet pepper and evaluation of their antimicrobial and mutagenic activities. **Journal of Food Biochemistry**, 2009. 33, 853-868.

NIRANJAN, K.; HANMOUNGJAI, P., PYLE, D.L. Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 77: 771-776, 2002.

NOGUEIRA, LÍLIA. **Composição química e atividade antioxidante de diferentes variedades de pimento (*Capsicum annum* L.)**. Dissertação (Mestrado). Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 2013.

NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D. e YUNES, R.A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NOVOZYMES, **Biotimes**, Editora Susanne Strand, ano XX, nº1, 2005.

NUNES, I. L e MERCADANTE, A. Z. Vantagens e desvantagens das Colunas C 18 e C 30 Separação de carotenoides por CLAE. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42. n.4, p.539-546, 2006.

OGISO Y.; HOSODA-YABE R.; KAWAMOTO Y.; KAWAMOTO T.; KATO K.; YABE T. An Antioxidante of Dried Chilli pepper Maintained Its Activity Through Postharvest Ripening for 18 Months. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** V.12, n.72, p. 3297 – 3300, 2008.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização Química, Avaliação da Atividade Antioxidante *In Vitro* e Atividade Antifúngica de Pimentas do Gênero *Capsicum spp.*** 82f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)– Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 34, n. 3, p. 231-247, dez. 2009.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 852-857, jul./ago. 2003.

PESCHEL, W., SÁNCHEZ-RABANEDA, F., DICKMANN, W., PLESEHEN, A., GARTIZA, I., JIMÉNEZ, D., LAMUELA-RAVENTOS, R., BUXADERAS, S., CODINA, C, An Industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetables and fruit wastes. **Food Chemistry** 137-150, 2006.

PINTO, G. A. S. **Procedimento operacional padrão – Determinação da atividade de  $\alpha$ -amilase, poligalacturonase, celulase e invertase.** v 1, 2, 3 e 4. p. 1-5, 2002.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme assisted extraction of bioactives from plants. **Trend in Biotechnology** 30, 1, p. 37-44, 2012.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil.** Brasília: EMBRAPA, 113p., 2000.

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

RODRIGUES, DENISE CELESTE GODOY DE ANDRADE.; SANTOS, TELMA TEMÓTEO DOS. **Manual de Práticas de Processos Bioquímicos- Apostila das Aulas Práticas**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, DELIA B. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos** / Delia B. Rodriguez-Amaya, Mieko Kimura e Jaime Amaya-Farfan [autores]; Lidio Coradin e Vivian Beck Pombo, Organizadores. Brasília: MMA/SBF, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A Guide to carotenoid analysis in foods. Washington, DC: **International Life Sciences Institute (ILSI)** Press, 71 p. 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Harvest Plus Hand book for Carotenoid Analysis. Washington DC e Cali: **International Food Policy Research Institute (IFPRI)** e **International Center for Tropical Agriculture (CIAT)**, 58 p, 2004.

ROMDHANE, M. and GOURDON, C. Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal**, 87, 11-19, 2002.

RUFINO, M.S.M; ALVES, R.E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas Pela Captura do Radical Livre ABTS**. Embrapa Agroindústria Tropical: Comunicado Técnico 127. Fortaleza-CE, p. 4, 2007.

SAJILATA, M. G. et al. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin- A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.7, n.1, p.29-49, 2008.

SANTAMARIA, R. L. ; REYES-DUARTE, M.D.; BARZANA, E.; FERNANDO, D.; GAMA, F.M.; MOTA, M.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chilli guajillo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.48, p3063-3067, 2000.

SANTOS, PHILIPPE; AGUIAR, ANA C.; BARBERO, GERARDO F.; REZENDE, CAMILA A.; MARTINEZ-JULIAN. Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2015.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das artes, 1996.

SIM, K. H.; SIL, H. Y. Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum*) pericarp and seed extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, 43, 1813-1823, 2008.

SGROPPO, S. C.; PEREYRA, M. V. Using mild heat treatment to improve the bioactive related compounds on fresh-cut green bell peppers. **International Journal of Food Science & Technology**, 44, 1793–1801, 2009.

TATSCH, P. O. (2008), **Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – Campus de Erechim.

TOCHI, B.N. ; WANG, Z.; XU, S. Y.; ZHANG, W. The influence of a pectinase and hemicelulases enzymes preparations on percentage pineapple juice recovery particulates and sensory attributes. **Park J. Nutr.** v. 8, p. 1184-1189, 2009.

TOPUZ, AYHAN; OZDEMIR, FERAMUZ. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected peppers cultivars (*Capsicum annum* L.) grown in Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 596-602, 2007.

VEKIARI, S. A.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C. D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists. Society**, Chicago, v. 70, n. 5, p. 483-487, 1993.

WAGNER, C. M. **Variedade e base genética da pungência e da caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L.** 104 p. Dissertação (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 609-614, 2003.

WU, JIANYONG.; LIN, LIDONG.; CHAU, FOO-TIM. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, V. 8, Issue 4, 347-352, October 2001.

ZETELAKI-HORVATH, K. Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Alimentaria**, v.11, n.1, p.21-29, 1982.

ZHUANG, YONGLIANG; CHEN, LONG; SUN, LIPING; CAO, J. Bioactive characteristics and antioxidants activities of nine peppers. **Journal of Functional Foods**. v.4, p. 331-338, 2012.

