UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA PIMENTA MALAGUETA (*Capsicum frutescens*)

PATRICIA LINS AZEVEDO DO NASCIMENTO

Recife

2012

PATRICIA LINS AZEVEDO DO NASCIMENTO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA PIMENTA MALAGUETA

(*Capsicum frutescens*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª. Drª. Ana Lúcia F. Porto.

Co-orientadoras: Profª. Drª. Keila A. Moreira.

Profª. Drª. Tania M. S. da Silva.

Recife

2012

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA PIMENTA MALAGUETA

(*Capsicum frutescens*)

PATRICIA LINS AZEVEDO DO NASCIMENTO

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM BIOCIÊNCIA ANIMAL.

Aprovada por:

Profª. Drª. Keila Aparecida Moreira UAG/UFRPE
(Presidente)

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga (FACETEG/UPE)
Membro Titular

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho (DCM/UFRPE)
Membro Titular

Profª. Drª. Tatiana Souza Porto (UAG/UFRPE)
Membro Titular

Profª. Drª. Tania Maria Sarmento Silva (DCM/UFRPE)
Membro Titular

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO ESPECIALMENTE:

Ao meu esposo Jailson, pela sua paciência, amor e confiança na minha capacidade e determinação.

Aos meus queridos pais Ailton e Severina, por terem me dado os meios para que eu pudesse chegar até aqui e onde mais eu queira ir. Seu amor e apoio irrestritos são fundamentais na minha existência. É maravilhoso tê-los por perto em cada vitória conquistada, meus amores.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo seu amor infinito, pela proteção e pela vida maravilhosa que me permite desfrutar.

À minha querida e tão amada **família,** pela enorme compreensão e total apoio em todos os momentos.

À minha **avó Luzinete** (*in memorian*) que mesmo sem sua presença física, me fez sentir seu amor e proteção em vários momentos dessa caminhada.

À **Profª. Drª. Ana Lúcia F. Porto** por ter confiado no meu potencial e ter aceitado minha orientação sem nunca ter me visto antes. Muito obrigada pela oportunidade de conhecê-la e ter sido mais uma filha científica.

À **Profª. Drª. Tania Maria Sarmento** pelo apoio e paciência ao me orientar em coisas que para ela seriam básicas, mas que para mim, eram mágicas. Por ter aberto as portas de seu laboratório e me feito conhecer seres humanos incríveis que fazem ciência com o mesmo prazer com que fazem amizade.

À **Profª. Drª. Keila Aparecida Moreira (Keilinha)** pelo seu carinho nas minhas crises de choro, por sua disponibilidade em pegar na mão para ensinar, pelos momentos de descontração e por ter me dado um presente tão especial: sua amizade. Admiro-te demais.

À **Profª. Drª. Tatiana Porto** pela atenção que sempre me dispensou. Pelos momentos de conforto e ajuda. Sua inteligência e competência são admiráveis. Vibro de felicidade por cada conquista sua, pois você fez por merecer cada uma delas.

Aos colegas do **Labtecbio**, em especial **Sheyllinha, Milena (Mili Q), Júlio e Eduardo Francisco (Edu)** pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo e pelo apoio durante momentos difíceis.

Aos colegas do **Biofito**: **Antônio, Telma, Natália, Rafaella, Tamires, Paulo, Raquel, Francyanna, Dário, Fernanda, Girliane e John**, pelos momentos de descontração, pela ajuda com todos aqueles equipamentos e testes, pelo carinho, pelos churrascos maravilhosos e por terem me apresentado um lugar tão peculiar e uma senhora tão simpática quanto a "Vó".

Aos colegas **Bioativos** da UAG: **Alana, Ana Carolina, Erick, Ivaldo, Roana, Mariana e Hugo** que formam um grupo cheio de amizade e responsabilidade.

À querida **Mitinha** (**Mitaliene**) que como o próprio nome diz é DE DEUS. Muito obrigada por ter entrado literalmente "de corpo e alma" no calor e ardor da minha pesquisa. Sua participação foi fundamental para minha iniciação na química de produtos naturais.

À minha amiga mais idosa, **Talita Camila** pela ajuda incansável, apesar da idade avançada. Afinal, dormir, comer, fins de semanas e feriados são para os fracos. A única forma que tenho para retribuir tanto carinho é lhe oferecendo minha amizade sincera. Obrigada.

Às queridas amigas **Silvana Alves** e **Rosângela Falcão**. Elas me ensinaram que podemos conhecer amigas de infância a qualquer momento de nossas vidas. Paciência, determinação, experiência, força de vontade, carinho, atenção, alegria de viver, inteligência, bom humor e muita amizade. Com essas palavras descrevo ambas e o que elas me ofereceram nestes anos de convivência. Adoro vocês.

Ao **Prof. Uoston Holder da Silva** pelo grande incentivo e estímulo, fundamentais para que eu iniciasse esta jornada. Obrigada pelo seu carinho.

À **Srª Nilva Maria** e **Drª Karina Melo** pelo apoio indispensável para que eu pudesse concluir esse curso. Sou muito grata a vocês.

Aos meus queridos colegas de trabalho **Amanda, Erlan, Fábio, Irancleide, Irlane, Jadison, Marisa, Lidiane, Luís Cláudio** e em especial à **Adriana Basílio** pela torcida, paciência e compreensão, fundamentais para que eu conseguisse

atingir mais este objetivo. Afinal, nós não cuidamos apenas das famílias, somos uma delas.

Ao **CENAPESQ/UFRPE**, **CENLAG/UAG** e **UPE/FACETEG,** pelo uso de suas instalações imprescindíveis à realização desta pesquisa. Um agradecimento especial à Wellington, aluno de iniciação científica da **UPE/FACETEG** pelo seu desprendimento, dedicação e disponibilidade para ajudar sempre.

A todos os excelentes professores que tive com os quais aprendi além de lições acadêmicas, lições de vida e de amor. Minha admiração por vocês deu-me forças para seguir adiante nos momentos de dificuldade.

A todos que de alguma forma, contribuíram para que chegasse até aqui. Obrigada.

Epígrafe

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque o ter consciência não obriga a ter teoria sobre as coisas, só nos obriga sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso.”

(HENFIL)

Sumário

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	24
2.	Revisão de Literatura.....	27
2.1	Uso de Produtos Naturais.....	27
2.2	Gênero *Capsicum*.....	29
2.3	Atividades farmacológicas da capsaicina.....	33
2.4	Flavonoides.....	40
2.4.1	Atividades biológicas dos flavonoides.....	42
2.5	Atividade antimicrobiana da pimenta.....	46
3.	Objetivos.....	48
	Referências.....	50
4.	Capítulo 1 - Atividade antimicrobiana e antioxidante da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*).....	58
5.	Capítulo 2 - Propriedades antioxidante e antimicrobiana de compostos isolados de *Capsicum frutescens.*.....	87
6.	Considerações Finais.....	116
	Anexos.....	117

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas dos capsaicinoides mais importantes..... 31

Figura 2. Estrutura básica de um flavonoide..... 40

Figura 3. Principais grupos de flavonoides 41

Capítulo 1

Figura 1. Cromatograma e espectro de UV (CLAE-DAD) do extrato etanólico de *C. frutescens*. (A) capsaicina e dihidrocapsaicina (280 nm), (B) Crisoeriol (320 nm)……..... 80

Figura 2. Atividade antioxidante do extrato etanólico de *C. frutescens* determinada por meio do teste β-caroteno/ácido linoleico. Colunas pretas – Trolox (16 µg/ml); Colunas brancas – extrato etanólico de *C. frutescens* (50 µg/ml)..... 81

Capítulo 2

Figura 1. Efeitos dos extratos hexânico e acetonitrila de *C. frutescens,* capsaicina e dihidrocapsaicina sobre radical DPPH (A), radical ABTS (B) e ensaio β-caroteno/ ácido linoleico em 60 minutos (C). SH: semente hexânica, SA: semente acetonitrila, CH: casca hexânica, CA: casca acetonitrila, FH: fruto inteiro hexânico, FA: fruto inteiro acetonitrila, DH: dihidrocapsaicina, C: capsaicina, AA: ácido ascórbico e T: Trolox..... 111

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Atividade antiradicalar (DPPH$^{\bullet}$ e ABTS$^{\bullet+}$) e teor de fenólicos totais do extrato etanólico de *C. frutescens.*..... 82

Tabela 2. Teor de fenólicos de várias espécies de *Capsicum*..... 83

Tabela 3. Concentrações de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol no extrato etanólico de *C. frutescens* (mg/g extrato ± DP)..... 84

Tabela 4. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de *C. frutescens* (mg/mL)..... 85

Capítulo 2

Tabela 1. Conteúdo de fitoquímicos nos extratos hexânico e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens.*..... 112

Tabela 2. Conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina de várias espécies de *Capsicum*..... 113

Tabela 3. Concentração inibitória mínima de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol..... 114

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
$ABTS^{\bullet+}$	Cátion radical ABTS
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CE_{50}	Concentração efetiva a 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação
d	Dupleto
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
$DPPH^{\cdot}$	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
FT	Fenólicos Totais
NP	Ácido difenilbórico etanolamina
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
Hz	Hertz
dl	Dupleto largo
J	Constante de acoplamento
CCD	Cromatografia de camada delgada

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Resumo

RESUMO

As pimentas que pertencem ao gênero *Capsicum* são bastante apreciadas em todo o mundo por exacerbar o sabor dos pratos e por apresentar propriedades biológicas benéficas à saúde. A pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) está entre as pimentas mais consumidas no Brasil. O ardor, assim como as propriedades biológicas desse gênero, estão associados aos capsaicinoides e principalmente à capsaicina e dihidrocapsaicina que são encontrados em maior quantidade. Neste trabalho foi quantificado o teor do flavonoide crisoeriol, de fenólicos, e dos dois capsaicinoides nas sementes, cascas e frutos inteiros de pimenta malagueta em extratos etanólico, hexânico e acetonitrila; foram determinadas a concentração inibitória mínima da capsaicina, dihidrocapsaicina, crisoeriol e do extrato etanólico frente a sete micro-organismos; foi avaliada também a ação dos capsaicinoides e dos extratos contra os radicais $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$ e atividade antioxidante destes com o sistema β-caroteno/ácido linoleico. Para obtenção do extrato etanólico, os frutos frescos foram triturados e submetidos à extração com etanol, filtrados e concentrados em rota evaporador. Para a quantificação e obtenção dos extratos hexânico e acetonitrila, os frutos inteiros foram secos a 50ºC e separados sementes, cascas e alguns frutos inteiros para serem submetidos à extração em ultrassom. Inicialmente a extração se deu com hexano e após esta, com acetonitrila. Isolou-se e quantificou-se a capsaicina, dihidrocapsaicina e o crisoeriol por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE-DAD). O teor de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol encontrado nas cascas, sementes e frutos inteiros variou entre 0,4 e 164,3 mg/g de extrato. O teor de fenólicos totais variou entre 4,9 e 110,6 mg EAG/g extrato. O extrato com maior teor de fenólicos, capsaicina e dihidrocapsaicina foi obtido no fruto inteiro acetonitrila. A concentração efetiva para metade da resposta máxima (CE_{50}) da atividade sequestradora de radical livre frente aos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico] (ABTS) variaram respectivamente de 23,1 a 302,3 µg/mL e de 3,9 a 459,6 µg/mL. A capsaicina apresentou a melhor atividade antiradicalar para os dois radicais. A atividade antioxidante variou de 15,7 a 66,4%. O extrato acetonitrila do fruto inteiro apresentou a melhor atividade antioxidante entre os extratos e similar à atividade do Trolox ($p>0,05$). Os compostos isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente a maioria dos micro-organismos testados. O crisoeriol apresentou a melhor atividade antimicrobiana frente quatro dos sete micro-organismos testados, necessitando de 0,06 µg/mL para inibir o crescimento de *Escherichia coli*. A pimenta malagueta apresenta atividade antimicrobiana contra micro-organismos patógenos e atividade anti-radicalar e antioxidante, despertando grande interesse para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Capsicum frutescens*, crisoeriol, antimicrobiano, antioxidante.

Abstract

ABSTRACT

The peppers that belong to the genus *Capsicum* are greatly appreciated throughout the world by exacerbating the flavor of food and present biological properties beneficial to health. The chili pepper (*Capsicum frutescens*) is among the most peppers consumed in Brazil. The heat like the biological properties of this kind are associated with capsaicinoids and primarily capsaicin and dihydrocapsaicin which are found in high amounts. This work quantified the content of flavonoid, crisoeriol, phenolics, and two capsaicinoids in the seeds, bark and whole fruits in ethanolic, hexanic and acetonitrile extracts of chilli pepper. Were determined the minimum inhibitory concentration of capsaicin, dihydrocapsaicin, chrysoeriol and ethanolic extract against seven microorganisms, has also evaluated the action of capsaicinoids and extracts against radical DPPH• and ABTS•+ and antioxidant activity of these with β-carotene/ linoleic acid system. To obtain the ethanol extract, fresh fruits were crushed and subjected to extraction with ethanol, filtered and concentrated in rotavapor. To quantify and obtain hexanic and acetonitrile extracts, the whole fruits were dried at 50 °C and separated seeds, peels and some whole fruit to undergo ultrasound extraction. Initially extraction with hexane and gave up after this with acetonitrile. Was isolated and quantified capsaicin, dihydrocapsaicin and chrysoeriol by high performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD). The concentration of capsaicin, dihidrocapsaicina and crisoeriol found in the bark, seeds and whole fruits ranged between 0.4 and 164.3 mg/g extract. The total phenolic content ranged between 4.9 and 110.6 mg GAE/g extract. The extract with higher phenolic content, capsaicin and dihydrocapsaicin was obtained in acetonitrile whole fruit. The effective concentration for half-maximum response (EC_{50}) of free radical scavenging activity compared to the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) respectively ranged from 23.1 to 302.3 mg/mL and 3.9 to 459.6 mg/mL. Capsaicin had the best antiradical activity for both radicals. The antioxidant activity ranged from 15.7 to 66.4%. The acetonitrile extract of whole fruit showed the highest antioxidant activity of the extracts and it was similar to the Trolox activity ($p > 0.05$). The isolated compounds exhibited antimicrobial activity against most of microorganisms tested. The chrysoeriol had the best antimicrobial activity against four of the seven microorganisms tested, necessitating 0.06 µg/mL to inhibit the growth of *Escherichia coli*. The malagueta chili pepper has antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, anti-radical activity and antioxidant, arousing great interest for biotechnological applications.

Keywords: *Capsicum frutescens*, chrysoeriol, antimicrobial, antioxidant.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As pimentas contêm de moderado a altos níveis de substâncias químicas como fenóis, capsaicinoides e vitaminas que são componentes importantes da dieta humana devido a sua habilidade em reduzir o risco de doenças degenerativas (MENICHINI et al., 2009).

Os registros mais antigos do consumo de pimentas datam de aproximadamente nove mil anos, resultado de explorações arqueológicas em Tehuacán no México. Outros sítios arqueológicos pré-históricos (2500 a.C.) são conhecidos no Peru, nas localidades de Ancon e Huaca Prieta. O cultivo de pimentas era uma característica de tribos indígenas brasileiras. Esta cultura foi difundida devido às rotas de navegação no período 1492-1600 que permitiram que as espécies picantes e doces de pimentas e pimentões viajassem o mundo. A globalização do conhecimento e do uso da pimenta tem, possivelmente, seu registro principal no livro *"Historia stirpium"*, escrito por Leonhartus Fuchsius, em 1543, onde são apresentadas as primeiras ilustrações de pimentas com precisão científica. A partir de 1500, as sementes e frutos de pimentas e pimentões passaram a ser consumidas por povos de todas as origens, em quantidade crescente e em usos diversos (REIFSCHNEIDER; RIBEIRO, 2004).

A pimenta é descrita como um alimento funcional devido às suas propriedades biológicas que favorecem a prevenção e/ou tratamento de doenças (ALVES, 2006). A capsaicina dá à pimenta o seu caráter ardido e é responsável pelas propriedades benéficas à saúde pois apresenta atividade analgésica (SIMONE et al., 1998; PIRES et al., 2004; PASTRE et al., 2008), anti-inflamatória (KIM et al., 2003; PARK et al., 2004; VERGARA et al., 2006), anticancerígena (SURH, 1999; SURH, 2002; GIL, KANG, 2008; ERIN et al., 2008) e tem se mostrado eficaz no tratamento de neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, dor de osteoartrite e neuralgia trigeminal (FUSCO, ALESSANDRI, 1992; RAINS, BRYSON, 1995; CLAPHAM, 1997; FUSCO, GIACOVAZZO, 1997). Além disso, quando ingerida, influencia a liberação de endorfinas, causando uma agradável sensação de bem-estar (VERGARA et al., 2006).

As pimentas e os pimentões pertencem à família Solanaceae e ao gênero *Capsicum*. A pungência ou picância das pimentas deve-se a presença da capsaicina (FILHO, 2012). A capsaicina é um alcaloide estável, aparentemente não afetado pelo frio ou calor, solúvel em álcoois, gorduras e óleos (HENRIQUE, 2012). O grau de ardor é medido por meio de uma escala chamada de Unidades de Calor de Scoville, SHU ("Scoville Heat Units"), que varia de zero (pimentão) a dez (pimentas picantes) (GUIDOLIN, 2005).

As espécies do gênero *Capsicum* apresentam grande relevância econômica, pois dominam o comércio das especiarias picantes em vários países de clima tropical, subtropical e temperado (THAMPI, 2003). O gênero *Capsicum* compreende cerca de 27 espécies conhecidas (BONTEMPO, 2007). A produção de *Capsicum* é considerada importante para o agronegócio brasileiro. O cultivo de pimentas incentiva a agricultura familiar, como alternativa de diversificação da produção, aumentando a geração de emprego e a renda na agricultura do país (VILELA, 2004).

A pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) como é conhecida no Brasil, é uma das mais usadas na culinária e na medicina popular brasileira. Os frutos são pequenos e vermelhos quando maduros; tem aroma e sabor forte e bastante picante (BONTEMPO, 2007). Devido à grande importância dos frutos de *Capsicum* tanto para o consumo *in natura* quanto na industrialização, bem como o interesse da indústria farmacêutica nos capsaicinoides, se faz necessário um maior conhecimento científico a respeito destas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Uso de Produtos Naturais

O uso de produtos naturais, assim como de compostos puros ou extratos padronizados de plantas, fornecem oportunidades ilimitadas levando a obtenção de novas drogas pela associação da disponibilidade destes com sua diversidade química (COS et al., 2006).

A utilização de plantas para tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e que ainda aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde divulgou que 60% a 85% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA Jr.; PINTO; MACIEL, 2005).

Pode-se extrair vitaminas C e E, selênio, carotenoides, fitoestrógenos, fibras e ácido fólico, substâncias com propriedades protetoras ao organismo humano, de frutas, vegetais e cereais. Estes compostos podem agir independentemente ou em combinação com agentes anticâncer ou cardioprotetores por uma variedade de mecanismos (RICE-EVANS et al., 1997).

O Brasil, com sua enorme biodiversidade, pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas. Embora várias plantas sejam utilizadas com fins terapêuticos pela população, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem, assim como garantia de qualidade do produto ou de sua produção (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; FERREIRA, 2012).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais sempre tiveram grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como

protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, para a obtenção de adjuvantes (substâncias utilizadas na formulação de medicamentos) ou, ainda, para a elaboração de medicamentos exclusivamente à base de extratos vegetais, os medicamentos fitoterápicos (SHENKEL et al., 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em quase todas as suas reuniões recomendava que os países membros, especialmente os do terceiro mundo, procurassem ampliar o arsenal terapêutico para a saúde pública, através do aproveitamento das práticas de medicina caseira empregadas pela população destes países (MATOS, 2000).

Para muitas comunidades e grupos étnicos, o uso de plantas medicinais é o único recurso terapêutico disponível. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. O consumo de remédios caseiros à base de plantas é uma realidade assimilada não só pela indústria farmacêutica, como também pelo poder público (LÓPEZ, 2006).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta. Com cerca de 22% de todas as espécies vegetais conhecidas, o país possui um patrimônio genético potencialmente capaz de render-lhe benefícios econômicos (LÓPEZ, 2006).

Algumas características desejáveis das plantas medicinais são sua eficácia, baixo risco de uso, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Entretanto, para a formulação de fitoterápicos, é necessário um trabalho multidisciplinar já que para uma espécie vegetal ser corretamente selecionada, é preciso cultivo adequado e avaliação dos teores de princípios ativos para que seja manipulado e utilizado na clínica médica (TOLEDO et al., 2003).

O estudo das propriedades biológicas e a busca por princípios bioativos em plantas com o intuito de obter novos produtos fitoterápicos tem avançado

incessantemente em todo o mundo. Dentre as diversas plantas estudadas, as pimentas, que sempre foram utilizadas como condimentos, merecem destaque, pois exibem uma gama de propriedades fisiológicas e farmacológicas (ALVES, 2006). A presença de propriedades fitoterápicas, aliada à abundância e alto valor mercadológico do produto condimentar, valorizam a espécie nativa e impulsionam estudos mais aprofundados e direcionados acerca dos aspectos biológicos da planta, necessários para sua aplicação em cosméticos e produtos farmacêuticos (BERTOLDI, 2006).

Basicamente há dois gêneros de pimenta, *Piper* e *Capsicum*. As mais antigas são do gênero *Piper*, que são as sementes de plantas da família das Piperáceas. O princípio ativo mais importante desse gênero é a piperina. O gênero *Capsicum* compreende cerca de 30 espécies conhecidas e pertence à família Solanacea. O princípio ativo desse gênero é a capsaicina (BONTEMPO, 2007).

2.2 Gênero *Capsicum*

As pimentas são especiarias populares em muitas partes do mundo, apreciadas por seus atributos sensoriais de coloração, pungência e sabor (OCHI et al., 2003). A indústria alimentícia é a maior consumidora do gênero *Capsicum* que o utiliza como agente colorante e condimentar em molhos, sopas, carnes processadas, lanches, doces, bebidas alcóolicas e não alcóolicas (PINO et al., 2007).

No Brasil, as pimentas são cultivadas principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (FILHO, 2012). O Brasil já foi o primeiro produtor e consumidor mundial de pimentas, até o início dos anos 90, mas perdeu diversas posições no *ranking* e ficou atrás do México (maior mercado produtor e consumidor de pimentas do mundo), da Índia, Tailândia e alguns países africanos. A capital

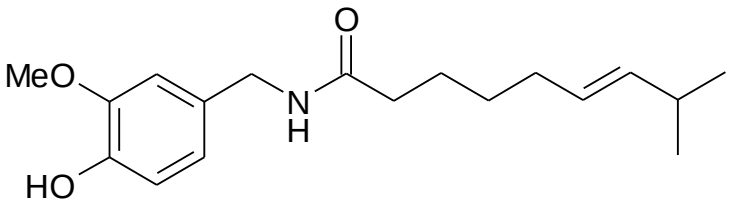
nacional da pimenta vermelha no Brasil é o município de Turuçu, no Rio Grande do Sul, que começou a cultivá-la no final do século XIX (BONTEMPO, 2007).

Há alguns anos relata-se que o consumo de certos alimentos e temperos como as pimentas podem exercer efeito satisfatório sobre a saúde. O gênero *Capsicum* origina-se de zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul, pertence à família Solanaceae e inclui pimentas de importante valor econômico. Existem várias espécies *Capsicum*, três das quais são muito propagadas e tem frutos com muita pungência: *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* (MENICHINI et al., 2009). A pungência do fruto *Capsicum* é devido a um grupo de compostos chamado capsaicinoides que estão presentes em diferentes quantidades nas variedades de pimentas (CONSTANT; CORDELL, 1995).

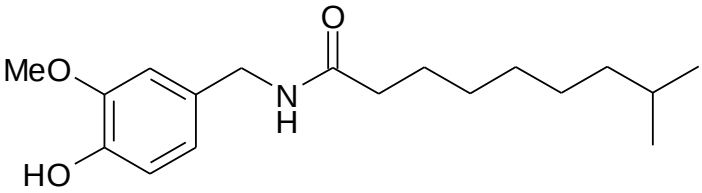
A capsaicina é um dos constituintes ativos do gênero *Capsicum*, junto com pelo menos 100 outros compostos, variando de capsaicinoides (capsaicina e análogos) a terpenos e substâncias químicas variadas (GOVINDARAJAN, 1986).

O principal componente pungente da pimenta é um composto hidrofóbico, incolor, inodoro, de cristalino a graxo que é conhecido como capsaicina. Quimicamente, a capsaicina é a 8-metil-*N*-vanilil-*trans*-6-nonenamida (SUZUKI; IWAI, 1984; BONTEMPO, 2007) (Figura 1). A capsaicina apresenta em sua estrutura química, além de uma função éter, a função fenol e uma função amida (CARVALHO, 2012).

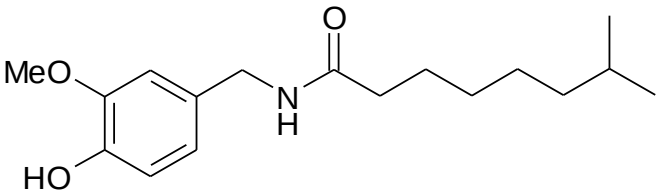
Outros capsaicinoides importantes encontrados no gênero *Capsicum* são a dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina, mas que são menos abundantes que a capsaicina (RUMSFIELD; WEST, 1991; KIRSCHIBAUM-TITZE et al., 2002). A capsaicina e dihidrocapsaicina são responsáveis por mais de 90% do ardor dos frutos *Capsicum* (GARCÉS-CLAVER, 2006; CISNEROS-PINEDA et al., 2007).



Capsaicina



Dihidrocapsaicina



Nordihidrocapsaicina

Figura 1. Estruturas químicas dos capsaicinoides mais importantes

O químico Wilbur Scoville (1912) desenvolveu um método para medir o nível de ardor das pimentas. Este teste foi chamado de teste organoléptico de Scoville. No teste original, Scoville preparava uma solução de pimenta moída com água e açúcar. Provadores ingeriam a solução em concentrações crescentemente diluídas, até não sentirem mais o líquido arder na boca. Um número foi então dado a cada pimenta, baseado no quanto que esta precisou ser diluída até que eles já não pudessem sentir o ardor. A pungência das pimentas é medida em múltiplos de 100 unidades, a partir do pimentão com zero unidade à white habanero com 300.000 unidades de Scoville. A pimenta malagueta tem elevado grau de pungência, oscilando entre 60.000 e 100.000 unidades Scoville. A capsaicina apresenta entre 15.000 e 16.000 e a dihidrocapsaicina 15.000 unidades de Scoville.

A sensação de calor provocada pelas pimentas deve-se à irritação de células trigeminais, localizadas na boca, nariz e estômago, as quais são basicamente receptores para a dor. Estes neurônios sensitivos lançam a Substância P, um neurotransmissor químico que comunica ao cérebro sobre a dor ou inflamação na pele. O consumo repetido de pimenta confunde receptores da Substância P e, por esta razão, algumas pessoas toleram comer cada vez mais pimentas, tendo a sensação de menos calor. Quando aplicada topicamente sobre a pele, a capsaicina ativa uma explosão da Substância P das fibras C (fibras nervosas de transmissão lenta, responsáveis pela dor prolongada), sendo este o início da sensação de queimação (BONTEMPO, 2007).

As pimentas contém uma grande quantidade de fitoquímicos como capsaicinoides, vitaminas C, D e E, além de compostos fenólicos e carotenoides, os quais são compostos que beneficiam a saúde (HOWARD et al., 2000; DEEPA et al., 2007; OBOH et al., 2007; ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011).

A biossíntese dos capsaicinoides ocorre na placenta vegetal, onde células epidérmicas especializadas os acumulam em vacúolos e finalmente excretam estes alcalóides e os gotejam sobre as sementes e superfície interna do pericarpo (CISNEROS-PINEDA et al., 2007).

Zimmer e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante e anti-inflamatória de *Capsicum baccatum* e determinaram o teor de fenólicos totais e conteúdo de flavonoides. O estudo demonstrou que os frutos de *Capsicum baccatum* apresentaram compostos com potencial antioxidante e anti-inflamatório que poderiam ser usados como protótipo em estudos de química medicinal para projetar novas drogas.

Ao estudar quatro variedades de *Capsicum annuum,* Hervert-Hernandez e colaboradores (2010) compararam o perfil bioativo e estimaram a extensão de bioacessibilidade intestinal do β - caroteno, β - criptoxantina e zeaxantina presentes nos frutos secos de pimenta usando um modelo gastrointestinal *in vitro.* Os autores concluíram que as quatro variedades de pimentas estudadas podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos antioxidantes que apresentam bioacessibilidade intestinal.

2.3 Atividades farmacológicas da capsaicina

Para determinar o nível tóxico letal dos capsaicinoides em animais, pesquisadores utilizaram ratos, camundongos, porquinhos-da-índia e coelhos. Foi avaliada a administração de capsaicina pura intravenosa, quando ingerida e aplicada topicamente, até a morte dos animais. A dose tóxica letal de capsaicina, medida em miligramas por Kg do animal foi de 0,56 mg intravenosa; até 190 mg, quando ingerida e 512 mg na aplicação tópica. A provável causa da morte em todos os casos foi parada respiratória. Para um indivíduo de 60 kg, este nível de toxicidade seria comparado ao consumo de aproximadamente 1,94kg de frutos de pimenta, portanto uma quantidade extremamente alta. Além de que a dor e a sensação de ardência dos frutos evitam que se consuma em excesso (GLINSUKON et al., 1980).

Quando aplicada topicamente ou injetada, a capsaicina produz dor em queimação, hiperalgesia ao calor na proximidade do local da aplicação e hiperalgesia mecânica numa área maior nos arredores (SIMONE et al., 1998).

Os resultados de Leelahuta e colaboradores (1983) encontrados em testes *in vivo* com ratos, camundongos e hamsters demostraram que ¾ da capsaicina administrada via oral é facilmente absorvida no estômago e intestino delgado e excretada nas fezes e urina. Os autores sugeriram ainda que microssomas do fígado

e rins dos animais são capazes de metabolizar a capsaicina. Ela seria metabolizada em pelo menos três produtos: um ácido vanílico (vanililacetamida) e os metabólitos 5-hidroxi-capsaicina e 3,4-dihidroxibenzil-8-metil-6-nonenamida.

Pastre e colaboradores (2008) utilizaram um gel com 0,025% de capsaicina com xilocaína a 10% cinco vezes ao dia durante 10 minutos por 30 dias a fim de verificar a diminuição da dor neuropática de uma paciente de 62 anos totalmente desdentada com grande reabsorção mandibular. Decorrido o período do tratamento, a dor cessou e a mesma foi reavaliada até 18 meses da conclusão do tratamento sem apresentar sintomatologia dolorosa.

Num estudo em humanos, Simone e colaboradores (1998) injetaram capsaicina em concentrações que variaram de 0, 2 a 20µg em um volume de 20µL nos braços de oito voluntários. Os autores testaram o limiar de dor ao calor, dor perfurante, ao frio e táctil. Os autores concluíram que a capsaicina pode ser utilizada em síndromes nas quais há avanço da patologia nervosa e a regeneração deste tecido é necessário para preservar ou restaurar a detecção de estímulos nocivos. Observaram então, que a capsaicina poderia ser útil para estudar mecanismos de regeneração de fibras nervosas intracutâneas e avaliar os efeitos neurotróficos e outros agentes farmacológicos em estudos correlacionados morfológicos e psicofísicos.

Numa análise do papel da proteína fosfatase 2A (PP2A) na resposta nociceptiva comportamental induzida pela injeção intradérmica de capsaicina na superfície plantar de ratos, Zhang e colaboradores (2003) observaram que a PP2A está envolvida na manutenção dos mecanismos de hiperalgesia (sensibilidade elevada a estímulos dolorosos) e alodinia secundárias (sensação dolorosa provocada por um estímulo geralmente não doloroso). A capsaicina causou aumento

no número de respostas às aplicações repetidas de estímulos mecânicos inócuos e nocivos, indicadores de hiperalgesia e alodinia.

O tratamento do nervo ciático com capsaicina pode aliviar a dor provocada pelos estímulos mecânicos e térmicos de um modelo de injúria de nervo espinhal. Duas semanas após a lesão do nervo ciático, os autores fizeram uma nova cirurgia envolvendo o nervo com uma gaze embebida em capsaicina 2% durante 30 minutos. Os autores concluíram que o uso da capsaicina foi eficaz no tratamento da hiperalgesia térmica, mas não na alodinia ao frio (KIM et al., 2008).

Pretendendo avaliar se a injeção intraplantar em ratos facilitaria a retirada de resposta ao estímulo térmico e mecânico, Gilchrist e colaboradores (1996) observaram que o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia, envolve mecanismos complexos tanto nos níveis de sistema nervoso central como periférico. Eles afirmaram que os mecanismos envolvidos requerem atenção multidisciplinar. A injeção intraplantar de capsaicina em ratos poderá ser um modelo útil para estudos de mecanismo neural básico e hiperalgesia térmica e mecânica, através de estudos paralelos de comportamento, eletrofisiológico e farmacológico.

Duff e colaboradores (1997) confeccionaram balas de pimenta que foram utilizadas por cinco pacientes com câncer (4 cabeça e pescoço e 1 transplante de medula óssea) em tratamento quimio e radioterápico. Os voluntários relatavam dor oral de moderada à forte. Depois da classificação da dor antes da terapia com a capsaicina, os voluntários consumiram as balas e relacionaram a dor clínica com o queimor da capsaicina a cada 2 minutos durante 20 minutos. Eles deixavam a bala se dissolver completamente na boca (entre 6 a 10 minutos). A dor média relacionada foi entre moderada e forte antes do tratamento, atingindo o máximo ligeiramente 6 minutos após consumo da bala. Decorridos 20 minutos, a sensação dolorosa estava

entre dificilmente detectável e fraca. Quem relatava dor oral de moderada a forte se beneficiou com a terapia com a bala de capsaicina. Dessensibilizar a boca é mais rápido do que a pele porque os receptores estão mais próximos da superfície. A dessensibilização requer a exposição à capsaicina seguida da remoção da mesma para ocorrer a diminuição do queimor.

A ação da capsaicina no dorso da língua de indivíduos voluntários foi avaliada por Ngom e colaboradores (2001). O estímulo foi repetido 10 vezes por sessão. Utilizava-se papel filtro embebido com capsaicina diluída em álcool depositado sobre a língua dos voluntários por 25 segundos. O estímulo era repetido após 15 segundos. Para avaliar a dor, utilizou-se uma escala a cada minuto durante cinco minutos e a cada dois durante os vinte minutos seguintes. Antes do experimento e no intervalo entre as aplicações, os voluntários bochechavam 30 mL de água deionizada por trinta segundos. Segundo os autores o modelo de capsaicina de dor oral permite uma boa confiabilidade e sensibilidade, e permite uma avaliação segura dos candidatos a analgésicos tópicos e drogas anestésicas.

A injeção de 0,1 µg de capsaicina intraplantar em tecidos inflamados promoveu a dessensibilização do receptor TRPV1 (receptor de potencial transitório da subfamília vaniloide do tipo 1), prolongando o efeito analgésico induzido por ela (BAAMOND et al.,2005). O receptor da capsaicina (TRPV1) é um transdutor de calor, o qual converte o calor intenso em atividade elétrica nos neurônios (CATERINA; JULIUS, 2001).

O receptor TRPV1 foi identificado em terminações e corpos celulares de neurônios do gânglio da raiz dorsal e do gânglio trigeminal, bem como em alguns tipos de células não neuronais. A exposição de fibras nociceptivas periféricas à droga não estimula apenas a função sensorial das fibras, mas também liberação de

neuropeptídeos ativos e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Em humanos ele corresponde à sensação de queimor e vermelhidão que são observadas depois da aplicação local de capsaicina. A aplicação repetida de capsaicina bloqueia o receptor com consequências refratárias das fibras nociceptivas, que se tornam insensíveis não só à capsaicina como a outros estímulos (ZSALLASI, 2002). Esse efeito dessensibilizante sugere que a capsaicina é uma ferramenta terapêutica em potencial na terapia da dor (WINTER et al,1995).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina é liberado dos nervos perivasculares do pâncreas com efeito sobre a vasomobilidade e liberação de citocina nos processos inflamatórios, incluindo pancreatite aguda. A capsaicina estimula a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina melhorando a microcirculação e reduzindo a inflamação na pancreatite aguda experimental (SCHNEIDER et al., 2009).

A capsaicina promove analgesia reduzindo a substância P em pequenos neurônios nociceptores de fibras em que o TRPV1 é predominantemente localizado. Ela liga-se ao receptor TRPV1 vaniloide, que atua como um integrador molecular de estímulos químicos e físicos da dor (HAYMAN; KAM, 2008).

Nociceptores são estruturas nervosas especializadas, localizadas nos terminais periféricos de nervos sensitivos, os quais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, convertendo esses estímulos em sinais neurais que são transportados para o sistema nervoso (MENEZES, 2008).

Menéndez e colaboradores (2004) afirmaram que a capsaicina induz um efeito analgésico após a resposta excitatória inicial. Foi realizada uma injeção intraplantar de 10 µg de capsaicina. Os autores observaram que os efeitos analgésicos da capsaicina são consideravelmente reforçados durante a inflamação, apoiando o fato

de que a estimulação do TRPV1 pode constituir uma estratégia adequada de evitar uma hiperalgesia inflamatória.

Segundo Mori e colaboradores (2006) a capsaicina induziu cerca de 80% das células tumorais de próstata de camundongo mantidas em cultura a acionarem os mecanismos bioquímicos que conduzem à morte celular, também chamada de apoptose. Como resultado, tumores tratados com capsaicina tinham cerca de um quinto do tamanho de tumores não tratados. A capsaicina também reduziu tanto a produção do antígeno prostático, uma proteína produzida em quantidades elevadas pelos tumores de próstata. Ainda segundo o estudo, a dose necessária para surtir o mesmo efeito nos seres humanos equivale à ingestão de três a oito pimentas vermelhas frescas, três vezes por semana. Os pesquisadores trabalharam com o extrato da pimenta mexicana *Habanera* que apresenta alto teor de capsaicina.

Petruzzi e colaboradores (2004) realizaram um estudo comparativo, triplo cego, com administração de capsaicina durante quatro semanas em pacientes com histórico de ardor bucal e observou-se melhora da dor bucal em 84% dos pacientes, comparado com o grupo controle. A eficácia terapêutica da capsaicina fortalece a hipótese de uma possível causa neurogênica na síndrome do ardor bucal, já que a capsaicina age nos mesmos receptores que captam os estímulos dolorosos.

Para avaliar o efeito da administração intranasal de capsaicina para enxaqueca crônica, Fusco e colaboradores (2003), realizaram um estudo duplo-cego com oito pacientes. O grupo da capsaicina recebeu 100 µL de uma emulsão contendo 300 µg de capsaicina dissolvidas em 80% de solução salina, 10% de parafina e 10% de Tween 80, aplicada em ambas as narinas uma vez ao dia durante sete dias. Por 10 dias antes e durante 30 dias após o início do tratamento, foi feita avaliação diária da intensidade da dor de cabeça. A queimação nasal foi bem

tolerada, pois durava no máximo 10 minutos. Os pacientes tratados com a capsaicina relataram melhora entre 50 a 80% da enxaqueca. Os autores sugeriram que a aplicação nasal da capsaicina é uma terapêutica eficaz contra a enxaqueca crônica.

O modelo de ativação nervosa sensorial da capsaicina é atraente porque os eventos moleculares envolvidos (ativação dos receptores TRPV1, entrada de cátions, despolarização das fibras C) são muito mais conhecidos que os envolvidos em outros modelos de dor queimante (ex.: formalina, veneno de abelha) quando vários tecidos e mediadores celulares estão envolvidos (SAWYNOK et al., 2006).

A eficácia de aplicações tópicas diárias de capsaicina na concentração de 0,025% em tratamento de prurido em cachorros com dermatite atópica e o efeito dessa terapia sobre concentrações cutâneas de substância P (neurotransmissor nociceptivo responsável pela modulação e sensação de dor) para avaliar a possível correlação entre o prurido e a presença de substância P na pele, foram avaliadas num estudo duplo-cego por Marsella e colaboradores (2002). Estes concluíram que as concentrações de substância P na pele não estavam relacionadas com a intensidade do prurido e não apresentaram mudança significativa durante ou entre as repetições do tratamento. Mas houve uma diminuição significativa do prurido depois do uso da capsaicina por seis semanas.

2.4 Flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos sintetizados a partir da via do fenilpropano, que após vários processos metabólicos, formam um esqueleto carbônico de 15 átomos, numa estrutura classificada como benzo-γ-pirona (DI CARLO et al., 1999). Este esqueleto carbônico é organizado em três anéis, sendo

dois aromáticos (denominados A e B) e entre ambos, o ciclo do anel C que é formado com três carbonos (Figura 3).

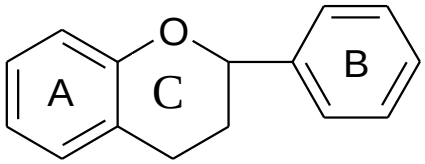
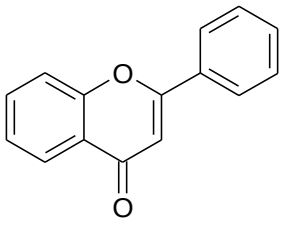
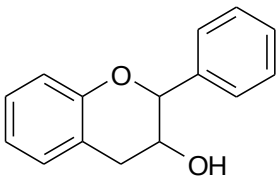


Figura 2. Estrutura básica de um flavonoide.

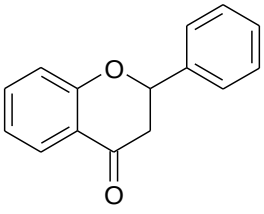
Os flavonoides são uma grande classe de compostos, onipresentes em plantas (CUSHNIE; LAMB, 2005), que usualmente ocorrem como glicosídeos. Emitem fluorescência brilhante quando são excitados pela luz ultravioleta. Eles contém várias hidroxilas com funções fenólicas ligadas a estrutura do anel chamadas de A, B e C. As variações estruturais dentro dos anéis subdividem os flavonoides em várias famílias: flavonóis (quercetina e kanferol), flavonas (luteolina, apigenina e crisina), flavanóis (catequina) e isoflavonas (genisteína) (Figura 2). Em mamíferos, os flavonoides são obtidos somente através da dieta. Estão presentes em frutas, vegetais, grãos, sementes, chás e vinhos (RICE-EVANS et al., 1997; HAVESTEEN, 2002).



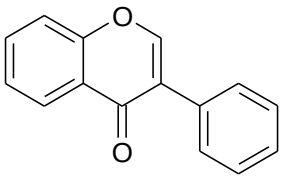
Flavona



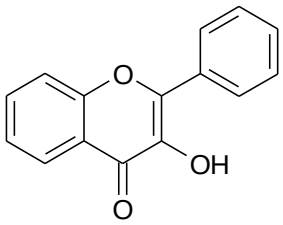
Flavanóis



Flavanona



Isoflavonas



Flavonóis

Figura 3. Principais grupos de flavonoides

Os flavonoides mais encontrados em pimentas são agliconas e glicosídeos de miricetina, quercetina, luteolina, canferol e apigenina (BAE et al., 2012).

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

As flavonas (luteolina e apigenina) ocorrem geralmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz. Em vegetais, os glicosídeos de quercetina predominam, mas glicosídeos de kanferol, luteolina e apigenina também estão presentes (HERTOG et al.,1992).

O método de escolha para determinação de flavonoides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção de flavonoides pelo método CLAE é baseada em absorção no UV-Vis e o uso da detecção por arranjo de diodos (DAD), que permite a escolha de vários comprimentos de onda, facilitando a identificação e quantificação dos flavonoides (MATTILA et al., 2000).

2.4.1 Atividades biológicas dos flavonoides

Os flavonoides são uma família de compostos derivados de plantas com atividade potencialmente exploráveis, incluindo diretamente atividade antimicrobiana, sinergismo com antibióticos e supressão da virulência bacteriana (CUSHNIE; LAMB, 2011). Segundo Trabulsi et al. (2004), os antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou membrana celular, afetar a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou síntese de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses micro-organismos.

Por serem compostos fenólicos, os flavonoides estão propensos à oxidação formando quinonas. Uma das propriedades mais discutidas dos flavonoides é sua habilidade de neutralizar os radicais livres (SAWAI et al., 2005).

Os radicais livres têm um papel importante no processo de envelhecimento e dano tecidual. São conhecidos por se ligarem covalentemente a macromoléculas de tecidos vitais, tais como proteínas e DNA. Favorecem reações em cadeia, como a peroxidação lipídica, ou podem gerar novas espécies de radicais. Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças como aterosclerose, câncer, cardiopatias, catarata, entre outras (ROY; KULKARNI, 1996).

Quimicamente, pode-se definir radical livre como qualquer espécie que contenha pelo menos um elétron desemparelhado que ocupe, por si, um orbital atômico ou molecular. Como exemplos, cita-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e o próprio oxigênio molecular (dioxigênio, O_2, um di-radical) (VIEIRA, 2012).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo

celular e pela exposição a fatores exógenos como: ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta inadequada e cigarro (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Flavonoides, α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), curcumina, proteínas do plasma, selênio, glutationa, clorofilina e *L*-cisteína são exemplos de antioxidantes não enzimáticos. Dentre os enzimáticos pode-se citar: superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoredutase, glutationa peroxidase e enzimas de reparo (SIES, 1993).

Exceto em micro-organismos anaeróbicos, em todos os sistemas biológicos, desde os mais simples, como os procariontes até os mais especializados como os mamíferos e plantas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo normal durante a produção de energia (SORG, 2004).

Os exemplos de ROS mais comuns são os radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), peroxila (RO_2), alcoxila (RO) e hidroperoxila (HO_2). O óxido nítrico (NO) e o dióxido de nitrogênio (NO_2) são espécies reativas de nitrogênio (SOUZA et al., 2007).

Há alguns anos, os antioxidantes são citados como agentes profiláticos e terapêuticos. Estes são os agentes que removem os radicais livres e espécies reativas de oxigênio e previne os danos causados por eles. Os radicais livres têm sido associados com patogênese de várias desordens como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e estão ainda relacionadas com o envelhecimento (RATNAM et al., 2006).

Quimioprevenção é definida como o uso de substâncias naturais ou sintéticas para prevenir a formação do câncer ou o progresso deste. Na literatura têm sido cada vez mais relatadas as evidências que os compostos fenólicos podem ter um potencial efeito inibitório sobre a invasão do câncer e metástases. A metástase é um agravante que aumenta o risco de morte relacionada ao câncer. Alguns compostos como a capsaicina (SHIN et al., 2008), o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico são sugeridas como substâncias anticancerígenas ou antimetástases (WENG; YEN, 2012).

Alimentos ricos em ácidos fenólicos possuem propriedades inibitórias contra comportamentos invasivos e metastáticos (p.ex.: adesão, migração e angiogênese) de uma variedade de células cancerígenas *in vitro* e/ou *in vivo* (WENG, YEN, 2012).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais (BARBOSA et al., 2010).

Antioxidantes são necessários para evitar a formação e se opor a ações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são gerados *in vivo* e causam danos ao DNA, lipídios, proteínas e outras biomoléculas. Defesas antioxidantes endógenas (p.ex.: superóxido dismutase) são inadequados para evitar completamente os danos, de modo que dietas antioxidantes são importantes na manutenção da saúde. O interesse também é crescente no papel de compostos fenólicos das plantas,

especialmente flavonoides. Alguns antioxidantes podem exercer efeitos pró-oxidantes *in vitro*, mas a sua relevância fisiológica é incerta (HALLIWELL, 1996).

2.5 Atividade antimicrobiana da pimenta

A atividade antimicrobiana de polifenóis que ocorrem em alimentos vegetais e plantas medicinais tem sido extensivamente investigada contra uma vasta gama de micro-organismos (DAGLIA, 2012). Doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda uma ameaça para a saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina humana. O seu impacto é particularmente grande em países em desenvolvimento, devido à indisponibilidade relativa dos medicamentos e surgimento da resistência generalizada às drogas (COS et al., 2006).

As pimentas pungentes podem constituir fator de proteção quando agregados às formulações e preparações alimentares (CARVALHO et al., 2010). A capsaicina possui propriedades antimicrobianas que abrem portas para explorar o seu potencial como um inibidor natural de micro-organismos patogênicos em alimentos (DORANTES et al., 2000). Cruz et al. (2003) relacionaram a pungência das pimentas à atividade antibacteriana dos extratos destas plantas.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana da capsaicina, dihidrocapsaicina e do flavonoide crisoeriol isolados a partir da pimenta malagueta e atividade antioxidante da capsaicina e dihidrocapsaicina, assim como das cascas, sementes e frutos inteiros de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar quimicamente a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*).

2. Extrair e identificar os capsaicinoides e flavonoide da amostra de pimenta malagueta.

3.Purificar a capsaicina, dihidrocapsaicina e flavonoide isolados do extrato de pimenta malagueta.

4. Quantificar em HPLC a capsaicina, dihidrocpasaicina e crisoeriol de frutos, sementes, casca da pimenta malagueta e extrato etanólico.

5. Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos etanólico, hexânico e acetonitrila e dos capsaicinoides isolados da pimenta malagueta.

6. Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e dos compostos isolados da pimenta malagueta.

Referências

REFERÊNCIAS♣

ALVAREZ-PARRILLA, E.; LA ROSA, L.A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and Serrano peppers. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 59, p.163-173, 2011.

ALVES, M. K. **Avaliação da ação antinflamatória e antidislipêmica de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (Solanaceae) – pimenta dedo-de-moça.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BAAMOND, A. et al. TRPV1 desensitisation and endogenous vanilloid involvement in the enhanced analgesia induced by capsaicin in inflamed tissues. **Brain Res**. Bull. Phoenix, v. 67, p. 476-481, 2005.

BAE, H.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JIFON, J.; PATIL, B.S. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis. **Food Chem.** Barking, v. 130, p.751-758, 2012.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n.4, p.629-643, 2010.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi).** 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr**., Campinas, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

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

CARVALHO, J.C. Estrutura, solubilidade e ardência. < Disponível em: http://educacao.uol.com.br/quimica/pimentas-estrutura-solubilidade-ardencia.jhtm > Acesso em: 19.01.2012.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; CRUZ, F.T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfectivas alimentares. **Rev. Bras. Pl. Med**., Botucatu, v.12, n.1, p.8-12, 2010.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Ann. Rev. Neurosci.** Palo Alto, v.24, p.487-517, Mar. 2001.

♣ Referências em acordo com a norma 6023/2002 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Abreviação dos periódicos em conformidade com o MED LINE.

CISNEROS-PINEDA, O.; TORRES-TAPIA, L.W.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L.C.; CONTRERAS-MARTÍN, F.; GONZÁLEZ-ESTRADA, T.; PERAZA-SÁNCHEZ, S.R. Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico. **Food Chem.** Barking, v. 104, p.1755-1760, 2007.

CLAPHAM, D.E. Some like it hot: spicing up ion channels. **Nature**. London, v. 389, p. 783-4, 1997.

CONSTANT, H.L.; CORDELL, G.A. Separation and quantification of capsaicinoids using complexation chromatography. **J. Nat. Prod.** Cincinnati, v.58, n.12, p. 1925-1928, 1995.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **J. Ethnopharmacol.** Limerick, v.106, p. 290-302, 2006.

CRUZ, F.T. Avaliação da atividade antibacteriana de diferentes pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* e sua relação com o teor de capsaicinoides. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Editora da Universidade, 2003.

p.205-6.CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.** Amsterdam, v. 26, p.343-356, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.** Amsterdam, v. 38, p. 99-107, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Biotechnol**. London, v. 23, p.174–181, 2012.

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

DI CARLO, G..; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO. F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.** Oxford, v. 65, n.4,p. 337-353, 1999.

DORANTES , L.; COLMENERO, R.; HERNANDEZ, H.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; FERNANDEZ, E.; SOLANO, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v.57, p.125–128.

DUFF, V.B. et al. Oral analgesia with topical capsaicin in cancer patients: a tool for medical nutrition therapy. **J. Am. Diet. Assoc**. Chicago, v. 97, n. 9, p. A-26, 1997.

ERIN, N. et al. Vagotomy enhances experimental metástases of 4THMpc breast câncer cells and alters Substance P level. **Regul. Pept.** Amsterdan, v. 151, p.35-42, 2008.

FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. <Disponível em:

http://www.territoriosdacidadania.gov.br/dotlrn/clubs/redestematicasdeater/produtosemercadosdiferenciados/contents/photoflow-view/content-view?object_id=901294> Acesso em: 19/01/2012.

FILHO, G. A. F. Pimenta. <Disponível em: http://www.ceplac.gov.br/radar/pimenta.htm> Acesso em: 17/01/2012.

FUSCO, B.M.; ALESSANDRI, M. Analgesic effect of capsaicin in idiopathic trigeminal neuralgia. **Anesth. Analg.** Cleveland, v. 74, p. 375-7, 1992.

FUSCO, B.M.; GIACOVAZZO, M. Peppers and pain: the promise of capsaicin. **Drugs.** New York, v. 53, p.909-14, 1997.

FUSCO, B.M.; BARZOI, G.; AGRÒ, F. Repeated intranasal capsaicin applications to treat chronic migrains. **Br. J. Anaesth.** Altrincham, v. 90, p.812, 2003.

GARCÉS-CLAVER, A; ARNEDO-ANDRÉS, M.S.; ABADIA, J.; GIL-ORTEGA, R.; ÁLVAREZ - FERNÁNDEZ. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum fruits by liquid chromatography- Electrospray/time-of-flight mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 54, p.9303-9311, 2006.

GIL, YG; KANG, MY. Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. **Life Sci**. Oxford, v. 82, p. 997-1003, 2008.

GILCHRIST, H.D.; ALLARD, B.L.; SIMONE, D.A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, Amsterdam, v. 67, p. 179-188, 1996.

GLINSUKON, T.; STITMUNNAITHUM, V.; TOSKULKAO, C.; BURANAWUTI, T.; TANGKRISANAVINONT, V. Acute toxicity of capsaicin in several animal species. **Toxicon.** Oxford, v. 18, p. 215-220, 1980.

GOVINDARAJAN, V.S. Capsicum production, technology, chemistry and quality. Part II. Processed products, standards, world production and trade. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** Cleveland, v. 24, p. 207- 288, 1986.

GUIDOLIN, F.R. Resposta técnica. EEP SENAI/RS. 2005 <Disponível em: http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt214.pdf?PHPSESSID=eacfd0394bf9cff61879b31265f473ef > Acesso em: 15/03/2010.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu. Rev. Nutr.** Palo Alto, v. 16, p.33-50, 1996.

HAVESTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.** Oxford, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYMAN, M.; KAM, P.C.A. Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. **Curr. Anaesth. Crit. Care.** Edinburgh, v. 19, p. 338-343, 2008.

HENRIQUE, L. Química das pimentas. < Disponível em:

https://www.pimentas.org/forum/viewtopic.php?f=1&t=2174 > Acesso em: 12.01. 2012

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a Quantitative Hplc Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 40, n. 9, p. 1591-1598, 1992.

HERVERT- HERNANDEZ, D.; SAYAGO-AYERDI, S.G.; GOÑI, I. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity and intestinal bioaccessibility. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 58, n.6, p. 3399-3406, 2010.

HOWARD, L.R.; TALCOTT, S.T.; BRENES, C.H.; VILLALON, B. Changes in Phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* Species) as influenced by maturity. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 48, n.5, p. 1713-1720, 2000.

KIM, C.S. et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IkB-a degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cell. Signal.** Oxford, v. 15, p. 299-306, 2003.

KIM, S.M. et al. Local application of capsaicin alleviates mechanical hyperalgesia after spinal nerve transaction. Neurosci. Lett. Amsterdam, v. 433, p.199-204, 2008.

KIRSCHBAUM- TITZE, P.; HIEPLER, C.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 50, n.5, p. 1260-1263, 2002.

LEELAHUTA, Y.; GLINSUKON, T.; WANGPANISH, W. In vitro capsaicin metabolism in the rat, mouse and hamster: a preliminary report. **Toxicon.** Oxford, v. 21, suppl.3, p. 245-248, 1983.

LÓPEZ, C.A.A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento,** v.1, n.1, p.19-27, 2006.

MARSELLA, R.; NICKLIN, C.F.; MELLOY, C. The effects of capsaicin topical therapy in dogs with atopic dermatitis: a randomized, double-blinded, placebo- controlled, cross-over clinical trial. **Vet. Dermatol.** Oxford, v. 13, p. 131-139, 2002.

MARTINS, E.R; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. **Plantas Medicinais**. Viçosa,

MG:UFV, 2003. 220p.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 2ª ed. Fortaleza, 2000.

MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 48, n. 12, p. 5834-5841, 2000.

MENÉNDEZ. L. et al. The analgesic effect induced by capsaicin is enhanced in inflammatory states. **Life Sci.** Oxford, v. 74, p.3235- 3244, 2004.

MENEZES, M.S. Importância dos receptores de dor: receptores vanilóides e purinérgicos. Disponível em: http://www.saj.med.br/uploaded/File/novos_artigos/123%20%20Importancia%dos%20receptores%20de%20Dor%20%20Miriam%20Seligman%20Me.pdf <Acesso em 15/08/2008.

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M.R.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; DE CINDIO, B.; HOUGHTON, P.J.; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical contente and biological activity of *Capsicum Chinese* Jacq. Cv Habanero. **Food Chem.** Barking, v. 114, p.553-560, 2009.

MORI, A. et al. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. **Cancer Res.** Baltimore, v. 66, n. 6, p. 3222- 3229, 2006.

NGOM, P.I. et al. A human oral capsaicin model to assess topical anesthesic-analgesic drugs. **Neurosci. Lett**. Amsterdam, v. 316, p. 149-52, 2001.

OBOH, G.; PUNTEL, R.L.; ROCHA, J.B.T. Hot pepper (*Capsicum annuum,* Tepin and *Capsicum Chinese,* Habanero) prevents Fe^{2+} - induced lipid peroxidation in brain – *in vitro*. **Food Chem.** Barking, v. 102, p.178-185, 2007.

OCHI, T.; TAKAISHI, Y.; KOGURE, K.; YAMAUTI, I. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. **J. Nat. Prod.** Cincinnati, v. 66, n. 8, p. 1094-1096, 2003.

PARK, JY.; KAWADA, T.; HAN, IS. et al. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor α by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPARY ligand-like action as a novel mechanism. **FEBS Lett.** Amsterdam, v. 572, p. 266-70, 2004.

PASTRE,T; FAOT, F; WESTPHALEN, F; ROSA, R.S. Treatment of painful post-traumatic peripheral neuropathy with capsaicin in na edentulous patient with extreme resorption in the mental region: a case report. **J. Contemp. Dent. Pract.** Cincinnati, v.9, n. 3, p. 1-8, Mar. 2008.

PETRUZZI, M. Systemic capsaicin for burning mouth syndrome: short-term results of a pilot study. **J. Oral Pathol. Med.** Copenhagen, v.33, p. 111-114, 2004.

PINO, J. et al. Charaterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. **Food Chem.** Barking, v. 104, p. 1682-1686, 2007.

PIRES, P.A. et al. Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da Capsicum frutescens- Solanaceae (pimenta malagueta). **Rev. Univ. Rural.** Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 129-34, Jul./Dez. 2004.

RAINS, C.; BRYSON, H.M. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. **Drugs Aging.** Auckland, v. 7, p.317-28, 1995.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; RAVI KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **J. Control. Release.** Amsterdam, v. 113, p.189 – 207, 2006.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C.S.C. Sistema de produção de pimentas (Capsicum spp.): Introdução e importância econômica. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/ 2004. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/index.htm > Acesso em 16/03/2009.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.** Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROY, P.; KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v. 34, p. 563-570, 1996.

RUMSFIELD, J.A.; WEST, D.P. Topical capsaicin in dermatologic and peripheral pain disorders. **Ann. Pharmacother**. Cincinnati, v. 25, n.4, p. 381-387, 1991.

SAWAI, Y.; MOON, J.H., SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of Structure on Radical-Scavenging Abilities and Antioxidative Activities of Tea Polyphenols: NMR Analytical Approach Using 1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl Radicals. **J. Agric. Food Chem**. Washington, v. 53, p. 3598−3604, 2005.

SAWYNOK, J.;REID, A.; MEISNER, J. Pain behaviors produced by capsaicin: influence of inflammatory mediators and nerve injury. **J. Pain.** Philadelphia, v.7, n.2, p.134-41, Feb. 2006.

SCHNEIDER, L.; HACKERT,T.; HECK, M.; HARTWIG, W.; FRITZ, S.; STROBEL, O.; GEBHARD, M.M.; WERNER, J. Capsaicin reduces tissue damage in experimental acute pancreatitis. **Pancreas.** New York, v. 00, p. 1-5, 2009.

SCOVILLE, W.L. Note on Capsicum. **J. Am. Pharm. Assoc.** Easton, v. 1, p. 453, 1912.

SHENKEL, E. P.; GOSMANN,G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos.** In: SIMÕES, C.M.O.;SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognasia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001, p. 301-332.

SHIN, D.H.; KIM, O.H.; JUN, H.S.; KANG, M.K. Inhibitory effect of capsaicin on B16–F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. **Exp. Mol. Med**. Seoul, v. 40, p. 486–94, 2008.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **Eur. J. Biochem.** Berlin, v.215, p.213-219, 1993.

SIMONE, D.A. et al. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. **J. Neurosci**. Baltimore, v. 18, n.21, p. 8947-59, Nov. 1998.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P. A pesqusia e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. Bras. Farmacogn.** São Paulo, v. 12, p.35-40, 2002.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **C R Biol.** Paris, v. 327 p. 649-662, 2004.

SOUZA W.M.; BREHMER, F.; NAKAO, L.S.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Rev. Bras. Farmacogn.** São Paulo, v.17, p. 191-196, 2007.

SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. **Mutat. Res**. Amsterdan, v. 428, p. 305- 327, 1999.

SURH, Y. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v. 40, p. 1091-97, 2002.

SUZUKI, T.; IWAI, K. In: **THE ALKALOIDS: Chemistry and Pharmacology.** Brossi**,** A., Orlando: Academic, cap. 4, v. 23, p.227- 299, 1984.

THAMPI, P. S. S. A glimpse of the world trade in Capsicum. In: KRISHNA, A. Capsicum: The Genus Capsicum. 1 ed. **CRC Press**, New York, v.33, 2003.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA,L. L.; DA CRUZ, M.; BUFFON, M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacocinética. **Rev. Lecta,** v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VEIGA Jr., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERGARA, D.N.; LOZADA-REQUENA, I.; AGUIAR, J.O. Efecto de la capsaicina sobre la producción de TNF-α em células mononucleares. Estudo piloto. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica**, Lima, v. 23, n.1, p. 52-55, 2006.

VIEIRA, A.J.S.C. Radicais oxidantes: da química à biologia. Disponível em: http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_100_066_28.pdf < Acesso em: 09.01.12>

VILELA, N. J. Sistema de Produção de Pimentas (Capsicum spp.): coeficientes técnicos, custos, rendimentos e rentabilidade. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678 Versão Eletrônica Dezembro/2004. Disponível em: < http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/coeficientes.htm > Acesso em: 16/03/2009.

WENG, C.J.; YEN, G.C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treat. Rev.** New York, v. 38, p. 76–87, 2012.

WINTER, J.; BEVAN, S.; CAMPBELL, A. Capsaicin and pain mechanisms. **Br. J. Anaesth.** Altrincham, v.75, p. 157-168, 1995.

ZHANG, X. et al. The effects of protein phosphatase inibitors on nociceptive behavioral responses of rats following inradermal injection of capsaicin. **Pain**, Amsterdam, v. 106, p. 443-51. 2003.

ZIMMER, A.R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory proprerties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. **J. Ethnopharmacol.** Limerick, v. 139, p.228-233, 2012.

ZSALLASI, A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. **Am. J. Clin. Pathol**. Baltimore, v. 118, p. 110-21, 2002.

Capítulo 1

Artigo submetido à revista African Journal of Microbiology Research

Atividade antimicrobiana e antioxidante da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*)

Patrícia L. A. do Nascimento[1]*, Talita C. E. S. Nascimento[1], Natália S. M. Ramos[2], Girliane R. da Silva[2], Celso Amorim Camara[2], Tania M. S. Silva[2], Keila A. Moreira[1,3], Ana L. F. Porto[1]

[1] Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil.

[2] Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil.

[3] Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns- Pernambuco, CEP 55292-270, Brasil.

***Corresponding author.** E-mail: patricialanascimento@yahoo.com.br

Tel.: +55 8737645500

RESUMO

Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), como é conhecida no Brasil, é uma das espécies de pimenta mais usadas na culinária e na medicina popular brasileira. Foram analisadas as atividades antioxidante e antimicrobiana, o teor de fenólicos totais, capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol. O teor de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol encontrado foi de 9,2, 4,0 e 2,1 mg/g de extrato respectivamente. A concentração inibidora mínima foi determinada frente seis linhagens de bactérias e da levedura *Candida albicans*, mas para todos os micro-organismos testados foram necessárias concentrações superiores a 1000 µg/mL. O teor de fenólicos totais foi de 9,1 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato. O extrato etanólico de *C. frutescens* apresentou atividade eficiente frente aos radicais $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$ (CE_{50} de 302,3 e 82,6 µg/mL, respectivamente) e porcentagem de atividade antioxidante pelo ensaio β-caroteno/ácido linoleico que variou de 15 a 47%. Os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades biológicas são os óleos essenciais, alcaloides, glicosídeos, compostos fenólicos, terpenoides e flavonoides. Os nossos resultados sugerem que *C. frutescens* contém um potencial antimicrobiano e antioxidante que pode estar associado com o seu teor de fenólicos, capsaicinoides e flavonoides.

Palavras-chave: DPPH, sistema β-caroteno/ácido linoleico, capsaicina, *Capsicum frutescens*.

ABSTRACT

Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) as it is known in Brazil, is one of the pepper species most used in cooking and in Brazilian folk medicine. Antioxidant and antimicrobial activities, total phenolic compounds and capsaicin, dihydrocapsaicin and crisoeriol content were analyzed. The content of capsaicin, dihydrocapsaicin and crisoeriol found was 9.2, 4.0 and 2.1 mg/g extract, respectively. The minimal inhibitory concentration was determined against six bacteria strains and *Candida albicans* but for all of them were necessary concentrations higher than 1000 µg/ml. The total phenolic content was 9.1 mg GAE/g extract. The ethanolic extract of *C. frutescens* had an effective $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ scavenging (CE_{50} of 302.3 and 82.6 µg/ml respectively) and percentage of antioxidant activity by β-carotene/linoleic acid assay that ranged from 15 to 47%. The main groups of compounds extracted from plants with biological properties are essential oils, alkaloids, glycosides, phenolic compounds, terpenoids and flavonoids. Our results suggest that *C. frutescens* contains a potential antimicrobial and antioxidant that can be associated with its phenolic, capsaicinoids and flavonoid contents.

Keywords: DPPH, β-carotene/linoleic acid system, capsaicin, *Capsicum frutescens*.

INTRODUÇÃO

Capsicum (pimenta, Solanaceae) é um pequeno gênero compreendendo cerca de 30 espécies, algumas com variedades de grande importância econômica. Cinco espécies (*C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense, C. frutescens, C. baccatum* variedades *pendulum* e umbilicatum e *C. pubescens*) foram domesticados por nativos americanos (Moscone et al., 2007).

O maior número de espécies está concentrado no Brasil (Barboza e Bianchetti, 2005). *Capsicum frutescens* é uma planta popular encontrada em muitas partes do mundo, que tem sido amplamente utilizado como condimento de alimentos, agente colorífico, aditivo alimentar na pecuária e nas indústrias de alimentos e farmacêutica (Schweiggert et al., 2006;. Pino et al., 2007; Boonkird, Phisalaphong, Phisalaphong, (2008); Li et al., 2009; Zhuang et al., 2012). Sendo bastante consumida no Brasil e conhecida como "pimenta malagueta", há poucos relatos de estudos sobre a sua composição química e propriedades biológicas.

A pungência do fruto é característica do gênero, devido a substâncias exclusivas das pimentas, uma mistura conhecida como "capsaicinoides", que inclui mais de 20 alcaloides (vanilliaminas). A capsaicina, o principal componente desta mistura, está localizada na placenta dos frutos. Ela é um composto inodoro, solúvel em gordura que é rapidamente absorvido através da pele e que provoca uma sensação de queimadura no tecido de mamíferos quando entra em contato com o mesmo (Hayman e Kam, 2008).

O gênero *Capsicum* é uma rica fonte de compostos fenólicos (Howard et al., 2000), particularmente flavonoides como quercetina e luteolina (Lee et al., 1995). Fenólicos e polifenois estão entre os alimentos bioativos mais desejáveis por causa de sua atividade antioxidante (Naczk e Shahidi, 2006). Alguns estudos têm demonstrado

papéis de proteção dos flavonoides e carotenoides contra a doença cardíaca coronariana, derrames e alguns tipos de câncer. Estes efeitos protetores dos compostos fenólicos são atribuídos às suas atividades antiradicalar e de sinalização celular (Krinsky e Johnson, 2005; Oboh e Rocha, 2007).

Antioxidantes naturais são considerados serem multifuncionais e a sua atividade depende de vários parâmetros, tais como a multiplicidade e heterogeneidade da matriz, as condições experimentais e principalmente o mecanismo de reação (Gioti et al., 2009). Os compostos antioxidantes em alimentos desempenham papéis importantes como fatores de proteção da saúde e são também amplamente utilizados como aditivos em óleos e gorduras e na indústria alimentar para prevenir ou retardar a deterioração dos alimentos (Suhaj, 2006).

A atividade antimicrobiana de polifenóis que ocorrem em alimentos vegetais e plantas medicinais tem sido extensivamente investigada contra uma vasta gama de micro-organismos (Daglia, 2012). Doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda uma ameaça para a saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina humana. O seu impacto é particularmente grande em países em desenvolvimento, devido à indisponibilidade relativa dos medicamentos e surgimento da resistência generalizada às drogas (Cos et al., 2006). Preferencialmente, este deve estar sob a forma de novas classes de agentes antibacterianos como a alteração estrutural da droga para a qual a resistência já desenvolveu raramente fornecem uma solução principal. Inibição de mecanismos de resistência através do desenvolvimento de novos adjuvantes também representa uma estratégia importante (Cushnie e Lamb, 2011).

Neste estudo as atividades antioxidante e antimicrobiana e os teores de fenólicos totais do extrato etanólicos de *C. frutescens* foi avaliado. Também foram isolados, identificados e quantificados a capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimento Geral

Os espectros de absorção no infravermelho foram registados em pastilhas de KBr, utilizando um espectrofotômetro Varian 640 FT-IR com um acessório de funcionamento PIKE ATR na faixa de 4000-400 cm^{-1}. Foram utilizadas placas de CCD de sílica gel 60 F254 (E. Merck). Espectros de ^{1}H e ^{13}C RMN foram obtidos usando um espectrômetro Bruker DPX300 (300 MHz para ^{1}H e 75 MHz para ^{13}C) em DMSO-d_6. O ultrassom Ultra Cleaner 1400 (Unique, Indaiatuba, Brasil) foi usado para obter os extratos. O método analítico utilizado foi o de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu Corp Kyoto, Japão) equipado com coluna preparativa Luna C_{18} com 250 x 21,20 milímetros x 5 µm e pré-coluna Luna C_{18} de 21 mm (Phenomenex, Califórnia, EUA). O detector era um conjunto de diodos (DAD) SPD-M20A Prominence (Shimadzu Corp Kyoto, Japão), a temperatura do forno de 40 °C. O sistema consistia em duas bombas para solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A (Shimadzu Corp Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas num Rheodyne 7125i equipado com injetor de 20 µL. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Luna C-18 5µ 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm, Phenomenex, EUA). Todos os solventes utilizados são de grau HPLC comercial. Capsaicina, β- caroteno, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ácido linoleico, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- ácido carboxílico (Trolox), persulfato de potássio, 2,2 '-azinobis-(3 -etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

(ABTS), ácido gálico e reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Amostra de pimenta malagueta

Os frutos maduros de *C. frutescens* utilizados neste estudo foram comprados de um mercado local. Os cálices e pedicelos foram removidos manualmente.

Extração, isolamento e quantificação de compostos da pimenta malagueta

O fruto fresco maduro (800 g) foi extraído sucessivamente com etanol e obtido 157,69 g de extrato seco. O extrato etanólico foi submetido à análise antioxidante, antimicrobiana e teor de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol.

Para o isolamento e quantificação dos três compostos presentes no extrato etanólico por CLAE-DAD (Figura 1), os frutos (2,78 kg) foram secos numa estufa com circulação de ar (50 ºC) durante 24 horas e triturados em seguida. A amostra seca (1,9 kg) foi submetida inicialmente a extração com hexano (3 repetições) e após filtragem e remoção do solvente em evaporador rotativo a 40 °C, submetida à extração com acetonitrila (5 repetições). Ambas extrações ocorreram em ultrassom durante 30 minutos. O extrato acetonitrila foi solubilizado com metanol e injetado em CLAE. A fase móvel foi metanol/água (70:30), fluxo de 15 mL/min e volume de injeção de 500 µL. Após evaporação do metanol, o crisoeirol foi extraído com acetato de etila e a capsaicina e dihidrocapsaicina extraídas com diclorometano. Obteve-se 1.184 mg de capsaicina, 778 mg de dihidrocapsaicina e 36 mg do flavonoide. A capsaicina e dihidrocapsaicina foram identificadas por comparação com amostras autênticas, na análise por CCD e pontos de fusão. O ^{1}H e ^{13}C RMN foram utilizados para elucidar a estrutura do flavonoide como crisoeriol.

O flavonoide crisoeriol, a capsaicina e a dihidrocapsaicina foram quantificados usando o método do padrão externo com base na área dos picos. As análises foram

realizadas através da representação gráfica da curva de calibração. Para construir a curva de calibração para cada composto, soluções de concentrações entre 31,2 - 500 µg/mL foram preparadas a partir de cada solução, diluindo-se com metanol volumes adequados, os quais foram, então, relacionados com a área de medição. A área desses picos foram tabulados e a concentração correspondente de compostos foi calculada a partir da curva de calibração. Para cada amostra, as análises quantitativas foram realizadas três vezes em 280 nm.

Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do conteúdo fenólico total presente no extrato de etanol de *C. frutescens* foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Slinkard e Singleton, 1977; Gulcin et al., 2004) com modificações, utilizando ácido gálico como padrão composto fenólico. 300 µL da solução do extracto de etanol (1 mg/mL) foram adicionados 60 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 2460 µL de água destilada, sob agitação, durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionados à mistura 180 µL de carbonato de sódio (2%) e agitar durante 30 segundos, resultando numa amostra com concentração final de 100 µg/mL. Após duas horas de incubação, a absorbância da amostra foi estimada por espectrofotometria, medindo em comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) / g de extrato.

Atividade sequestradora do radical DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres na amostra foi determinada utilizando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) método espectrofotométrico segundo Silva et al., (2006). Este método é frequentemente usado para determinar a capacidade das espécies de plantas na captura de radicais livres (Kogure et al., 2004).

Uma solução de estoque de extrato etanólico de *C. frutescens* foi preparada a 5,0 mg/mL. Quantidades apropriadas da solução de etanol de $DPPH^{\bullet}$ (23,6 µg/mL) foram adicionados às amostras a fim de obter concentrações finais que variam de 100 µg/mL a 500 µg/mL. A absorbância foi medida a um comprimento de onda de 517 nm no espectrofotômetro, após um período de incubação de 30 minutos em ultrassom, no escuro. O valor de CE_{50} representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH. O ácido ascórbico foi utilizado como composto padrão.

Atividade sequestradora do radical $ABTS^{\cdot+}$

Este teste envolve a geração do cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ por oxidação de ABTS [2,2 '-azinobis-(3-etil-benzotialolina-6-sulfônico)] com o persulfato de potássio. O teste foi realizado de acordo com a Re et al., (1999) com modificações. O ABTS foi dissolvido em água, a concentração de 7 mM. O cátion radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) foi produzido por reação de solução de ABTS com persulfato de potássio 2,45 mM (concentração final) e deixando a mistura em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da utilização. Em seguida, a solução $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente), até uma absorbância de 0,7 ± 0,05 nm. A solução estoque do extrato etanólico foi preparada com uma concentração de 1,0 mg/mL. Quantidade apropriada de $ABTS^{\bullet+}$ (2700 µL) foi adicionado à amostra para se obter concentrações finais que variam de 20-120 µg/mL e mantidas no escuro em ultrassom, e após 10 minutos, a absorbância das amostras foram medidas a um comprimento de onda de 734 nm a espectrofotômetro. O controlo positivo utilizado foi Trolox (0,1 mg/mL).

Atividade antioxidante frente ao sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o teste β-caroteno de acordo com a Bamoniri et al., (2010) com modificações. A solução de ácido linoleico β-caroteno/ácido linoleico foi preparada por adição de uma alíquota de 150 µL de solução de β-caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) em Erlenmeyer de 250 mL com 160 µL de ácido linoleico e 660 µL de Tween 20, depois foram adicionados 140 mL de água destilada oxigenada . A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,6 e 0,7 nm no comprimento de onda de 470 nm. Alíquotas de extrato de etanol bruto de *C. frutescens* (50 µg/mL) foram comparados com o controle (sem antioxidante) e o Trolox (16 µg/mL), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial de absorbância foi realizada imediatamente após a adição das amostras e padrão ao sistema para determinar o tempo zero. Subsequentemente, a absorbância foi monitorizada a cada 20 minutos durante 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C durante a leitura. A capacidade antioxidante foi expressa como percentagem de inibição da oxidação.

Atividade antimicrobiana

Os micro-organismos utilizados neste estudo incluem *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007), foram fornecidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), Brasil.

O ensaio de microdiluição foi realizado de acordo com métodos de referência do CLSI M7 A6 para bactérias (Clinical Laboratory Standards Institute, 2003) e M27 A3 para leveduras (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008). Foram utilizados

microplacas de 96 poços para obter-se o valor de CIM do extrato bruto etanólico de pimenta malagueta contra os micro-organismos em estudo. A concentração final do extrato variou de 5 mg/mL a 25 mg/mL e as diluições foram preparadas com DMSO. A CIM foi determinada por medição de cada poço com um leitor de microplacas (ASYS UVM 340, Cambridge, UK). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de amostra que inibiu o crescimento bacteriano em comparação com a densidade óptica de crescimento controle. Cloranfenicol (50 µg/mL) foi utilizado como controle positivo para todas as cepas bacterianas e itraconazol (25 µg/mL) para as leveduras.

Análise estatística

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram reunidos e expressos como médias ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A eficácia anti-radicais livres foi estabelecida por análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como CE_{50} ± SD, o qual representa a concentração de amostra necessária para reduzir a absorbância de $DPPH^{\bullet}$ ou $ABTS^{\bullet+}$ em 50% em comparação com o controle negativo (DPPH ou $ABTS^{\bullet+}$ sem solução de amostra).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conteúdo fenólico total

A determinação do conteúdo fenólico total utilizando o método de Folin-Ciocalteu é um método conveniente, simples e rápido para a estimativa do conteúdo fenólico total de várias amostras (Singleton et al., 1999). Vários autores avaliaram o conteúdo de fenólicos de pimentas diferentes espécies do gênero *Capsicum* com a

utilização de variadas técnicas e solventes para a extração dos constituintes químicos de pimentas.

Pimentas contêm níveis moderados a elevados de compostos fenólicos neutros ou flavonoides, fitoquímicos que são componentes antioxidantes importantes que podem reduzir o risco de doenças degenerativas (Hasler, 1998). O extrato etanólico de *C. frutescens* deste estudo mostrou um maior teor de fenólicos (Tabela 1) que a maioria daqueles relatados em estudos anteriores (Tabela 2). Essas diferenças podem ser explicadas por variações na preparação de amostras, extração e métodos de quantificação, formas químicas de compostos analisados, a diversidade de variedades e genótipos (como pimentas doces ou ardidas), fase de maturação, e da utilização de frutos frescos ou desidratados.

Quantificação do conteúdo de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol

O grupo de componentes pungentes peculiares aos frutos dessas plantas é chamado capsaicinoides (Topuz e Ozdemir, 2007). Flavonoides e capsaicinoides são os fenólicos predominantemente encontrados em espécies *Capsicum* (Naczk e Shahidi, 2006). Dois membros da família capsaicinoide e um flavonoide foram determinados a partir de extrato etanólico de *C. frutescens* (Tabela 3). Capsaicina e dihidrocapsaicina são os mais pungentes capsaicinoides e são responsáveis por até 90% do total de pungência frutos de pimenta (Topuz e Ozdemir, 2007; Menichini et al, 2009). Alguns autores avaliaram o conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina em *C. frutescens* e encontraram valores variando de 0,72 a 3,7 e 0,75-2,4 mg/g peso seco, respectivamente (Garcez-Claver et al., 2006; Ozguven e Yaldiz, 2011). Curiosamente, nossos resultados mostraram conteúdo notável de capsaicina e dihidrocapsaicina (9,2 e 4,0 mg/g de extrato). Quanto ao conteúdo de flavonoides, a maioria dos estudos sobre pimentas têm se concentrado em agliconas de

flavonoides (quercetina e luteolina) (Materska et al., 2005; Marín et al., 2004). A concentração do flavonoide crisoeriol (3'-metoxi-luteolina) encontrada neste estudo foi de 2,1 mg/g de peso seco, resultado superior aos achados por Howard et al., (2000) que publicaram resultados de 0,03 mg/g para *C. frutescens*. Os capsaicinoides e conteúdo de flavonoides podem ser afetados por diferentes fatores, como o estágio de desenvolvimento do fruto, a técnica de extração, as espécies e as condições ambientais de crescimento (Menichini et al., 2009; Ornelas-Paz et al., 2010).

Atividade sequestradora dos radicais DPPH e ABTS

Estudos baseados no uso de radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$ estão entre os métodos mais populares espectrofotométricos para determinação da capacidade antioxidante de alimentos, bebidas e extratos vegetais. Estes métodos têm sido frequentemente utilizados para avaliar a atividade antioxidante dos compostos por meio de métodos que são simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis (Özçelik et al., 2003).

No ensaio de $DPPH^{\bullet}$, os antioxidantes são capazes de reduzir radical DPPH da cor púrpura a cor amarela ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, mantendo-se estável. A atividade antiradicalar é avaliada através da diminuição da absorbância (Roginsky e Lissi, 2005). Este ensaio tem sido utilizado frequentemente para avaliar a capacidade antioxidante de frutas e vegetais (OU et al., 2002; Imeh e Khokhar, 2002; Deepa et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2011).

Como pode ser visto na Tabela 1, o extrato etanólico de *C. frutescens* mostrou menor capacidade antioxidante do que o controle positivo ácido ascórbico. Estes resultados são corroborados por Zhuang et al., (2012). No entanto, outras espécies de *Capsicum* foram avaliadas e também exibiram valores de CE_{50} maiores que o controle (Locatelli et al., 2009; Zimmer et al., 2012).

A função do método de ensaio de cátion radical ABTS é monitorar o decaimento dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ produzido pela oxidação de 2,2 '-azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) (ABTS), causada pela adição de uma amostra contendo fenóis. O $ABTS^{\bullet+}$ tem uma absorção forte e pode ser facilmente determinado por espectrofotometria, medindo em comprimento de onda de 600-750nm. Na ausência de fenólicos, o $ABTS^{\bullet+}$ é muito estável, mas reage com um doador de energia do átomo de H, e é convertido para uma forma incolor (Roginsky e Lissi, 2005). A CE_{50} para o ABTS neste estudo (Tabela 1) foi menor do que a encontrada por Hervert-Hernandez et al., (2010) e Locatelli et al., (2009) que pesquisaram outras espécies de pimenta. Apesar do elevado conteúdo de compostos fenólicos, a atividade antioxidante mais baixa em comparação com o padrão pode ser justificada porque os extratos brutos produzidos contêm também substâncias não fenólicas, tais como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e pigmentos, que podem interferir na avaliação antioxidante (Kahkonenet al., 2001).

Atividade antioxidante frente ao sistema β-caroteno/ácido linoleico

O ensaio β-caroteno é baseado na perda da cor amarelada do β-caroteno devido sua reação com os radicais formados pela oxidação do ácido linoleico em uma emulsão (Silvestre et al., 2012). Este ensaio avalia o efeito inibitório de um composto ou uma mistura de oxidação de β-caroteno na presença de oxigênio molecular (O2). Ensaio do β-caroteno remanescente dá uma estimativa do potencial antioxidante da amostra (Bamoniri et al., 2010).

A taxa de β-caroteno pode ser retardada na presença de antioxidantes (Oke et al., 2009). Assim, o extrato etanólico de *C. frutescens* apresentou atividade antioxidante em todos os tempos testados. A percentagem de atividade antioxidante variou de 15

a 47% (Figura 2). Aos 60 minutos (metade do tempo total), a atividade antioxidante foi de 29%.

Os frutos contêm uma ampla variedade de compostos fenólicos complexos, os quais são usualmente ligados com açúcares. Alguns dos compostos fenólicos presentes em maiores quantidades são flavonoides, derivados de ácido cinâmico e capsaicinoides (Materska e Perucka, 2005). Além disso, a atividade antioxidante dos frutos da pimenta pode ser atribuída também ao ácido ascórbico e carotenoides. Daí, a importância de uma adequada correlação dos valores de atividade antioxidante com constituintes da pimenta por causa da influência de outros compostos solúveis, além de polifenóis, presentes nos extratos que podem afetar a capacidade antioxidante total (Hervert-Hernández et al., 2010).

Atividade antimicrobiana

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) em mg/mL de extrato etanólico de *C. frutescens* são mostrados na Tabela 4. Nossos resultados mostraram que as bactérias Gram positivas e Gram negativas e levedura testadas foram inibidas pelo extrato etanólico de *C. frutescens*. O melhor efeito inibitório e os menores valores de CIM foram contra bactérias Gram-positivas. Graças à sua membrana protetora exterior adicional, bactérias Gram-negativas são geralmente muito mais resistentes aos agentes antibacterianos do que as Gram positivas (Bamoniri et al., 2010). Mas, no entanto, os valores de CIM encontrados aqui vai contra os critérios adotados por alguns autores (Cos et al, 2006.; Ríos e Recio, 2005; Mbosso et al., 2010), que só consideram que para exibir atividade antimicrobiana são necessárias concentrações de até 1 mg/mL de extratos ou 0,1 mg/mL para os compostos isolados para que essa atividade possa ser levada em consideração.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico de *C. frutescens* mostrou atividades antimicrobiana e antioxidante, sendo necessárias concentrações elevadas para ser eficaz. A atividade antioxidante pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides, encontrados em algumas espécies de *Capsicum*. O subsequente isolamento de compostos possuindo propriedades antimicrobianas pode reduzir as concentrações necessárias para inibir o crescimento de micro-organismos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq, CAPES e PRONEM - FACEPE para apoio financeiro e as centrais analíticas CENAPESQ/UFRPE, CENLAG/UAG e FACETEG/UPE pelas instalações utilizadas.

REFERÊNCIAS

Alvarez-Parrilla E, La Rosa LA, Amarowicz R, Shahidi F (2011). Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and Serrano peppers. J. Agric. Food Chem. 59: 163-173.

Bamoniri A, Ebrahimabadi AH, Mazoochi A, Behpour M, Kashi FJ, Batooli H (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. Food Chem. 122: 553–558.

Barboza GE, Bianchetti LB (2005). Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. Syst. Bot. 30:863-871.

Boonkird S, Phisalaphong C, Phisalaphong M (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from Capsicum frutescens on a lab- and pilot- plant scale. Ultrason. Sonochem. 15:1075–1079.

Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. M7-A6.

Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. (2008). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 3rd. ed. Wayne, PA: CLSI. M27-A3.

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J. Ethnopharmacol. 106: 290-302.

Cushnie TPT, Lamb AJ (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents. 38: 99-107.

Daglia M (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23:174–181.

Deepa N, Kaur C, George B, Singh B, Kapoor HC (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. Food Sci. Technol*.* 40: 121-129.

Garcés-Claver A, Arnedo-Andrés MS, Abadia J, Gil-Ortega R, Álvarez-Fernández A (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography- Electrospray/time-of-flight mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 54: 9303-9311.

Ghasemnezhad M, Sherafati M, Payvast GA (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. J. Funct. Foods. 3: 44–49.

Gioti ME, Fiamegos YC, Skalkos DC, Stalikas CD (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. Food Chem.117: 398-404.

Gülçin I, Beydemir S, Elmastas M, Kufrevioglu OI (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophylata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chem. 87: 393–400.

Hasler CM (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health. Food Technol. 52: 63-69.

Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. J. Agric. Food Chem. 53: 2928-2935.

Hayman M, Kam PCA (2008). Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. Curr. Anaesth. Crit. Care., 19, 338-343.

Hervert- Hernandez D, Sayago-Ayerdi SG, Goñi I (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity and intestinal bioaccessibility. J. Agric. Food Chem. 58: 3399-3406.

Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. J. Agric. Food Chem. 48: 1713– 1720.

Imeh U, Khokhar S (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. J. Agric. Food Chem. 50: 6301–6306.

Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh WP, Huang D, Ong CN (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. Food Chem. 120: 993–1003.

Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. (2001). Beery phenolics and their antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 49: 4076–4082.

Kogure K, Yamauchi I, Tokumura A, Kondou K, Tanaka N, Takaishi Y, Fukuzawa K (2004). Novel antioxidants isolated from plants of the genera Ferula, Inula, Prangos and Rheum collected in Uzbekistan. Phytomedicine. 11: 645-651.

Krinsky NI, Johnson EJ (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol. Aspects Med. 26: 459-516.

Lee Y, Howard IR, Villalón B (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. J. Food Sci. 60: 473-476.

Li F, Lin Y, Wang X, Geng Y, Wang D (2009). Preparative isolation and purification of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* using high-speed counter-current chromatography. Sep. Purific. Technol. 64: 304–308.

Locatelli M, Gindro R, Travaglia F, Coïsson J, Rinaldi, M, Arlorio M (2009). Study of the $DPPH^{\bullet}$- scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. Food Chem. 114: 889-897.

Marín A, Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Gil MI (2004). Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Agric. Food Chem. 52: 3861−3869.

Materska M, Perucka I (2005). Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). J. Agric. Food Chem. 53: 1750−1756.

Mbosso EJT, Ngouela S, Nguedia JCA, Beng VP, Rohmer M, Tsamo E (2010). *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. J. Ethnopharmacol.128: 476–481.

Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F (2009). The influence of fruit ripening on the

phytochemical content and biological activity of *Capsicum Chinese* Jacq. Cv Habanero. Food Chem. 114: 553-560.

Moscone EA, Scaldaferro MA, Grabiele M, Cecchini NM, Garcia YS, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE, Ehrendorfer F (2007). The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum* - Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. Acta Hort. 745: 137-169.

Naczk M, Shahidi F (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 41: 1523–1542.

Oboh G, Rocha JBT (2007). Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and unripe tree pepper (*Capsicum pubescens*). J. Food Biochem. 31: 456-473.

Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia.*Ten. Food Chem. 112: 874-879.

Ornelas-Paz JJ, Martínez-Burrola JM, Ruiz-Cruz S, Santana-Rodríguez V, Ibarra-Junquera V, Olivas GI, Pérez-Martínez JD (2010). Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. Food Chem. 119: 1619–1625.

Ou B, Huang D, Hampschwoodwill M, Flanagan TA, Deemer EK (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity and FRAP assays: A comparative study. J. Agric. Food Chem. 50: 3122–3128.

Ozguven, M., Yaldiz, G. (2011). Capsaicin contents of different *Capsicum* (Red Peppers) populations and varieties. Adv. Environ. Biol. 5, 1991-1995.

Özçelik B, Lee JH, Min DB (2003). Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. J. Food Sci. 68: 487-490.

Pino J, González M, Ceballos L, Centurión-Yah AR, Trujillo-Aguirre J, Latournerie-Moreno L, Sauri-Duch E (2007). Charaterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. Food Chem. 104: 1682-1686.

Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresour. Technol. (*in press)*.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26: 11231-1237.

Ríos JL, Recio MC (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol.100: 80–84.

Roginsky V, Lissi EA (2005). Review of methods to determinate chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem. 92: 235-254.

Schweiggert U, Carle R, Schieber A (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Anal. Chim. Acta. 557: 236–244.

Silva TMS, Câmara CA, Lins ACS, Barbosa JM, Silva EMS, Freitas BM, Santos FAR (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee Melipona subnitida Ducke. J. Food Compos. Anal. 19: 507-511.

Silvestre RG, Moraes MM, Lins ACS, Ralph MT, Lima-Filho JV, Camara CA, Silva TMS (2012). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. Afr. J. Biothecnol. 11: 9888-9893.

Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178.

Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult. 28: 49–55.

Suhaj M (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. J. Food Compos. Anal. 19: 531-537.

Topuz A, Ozdemi F (2007). Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. J. Food Compos. Anal. 20: 596–602.

Zhuang Y, Chen L, Sun L, Cao J (2012). Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. J. Funct. Foods. 4: 331–338.

Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, Oliveira JR, Gosmann G (2012). Antioxidant and anti-inflammatory proprerties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. J. Ethnopharmacol. 139: 228-233.

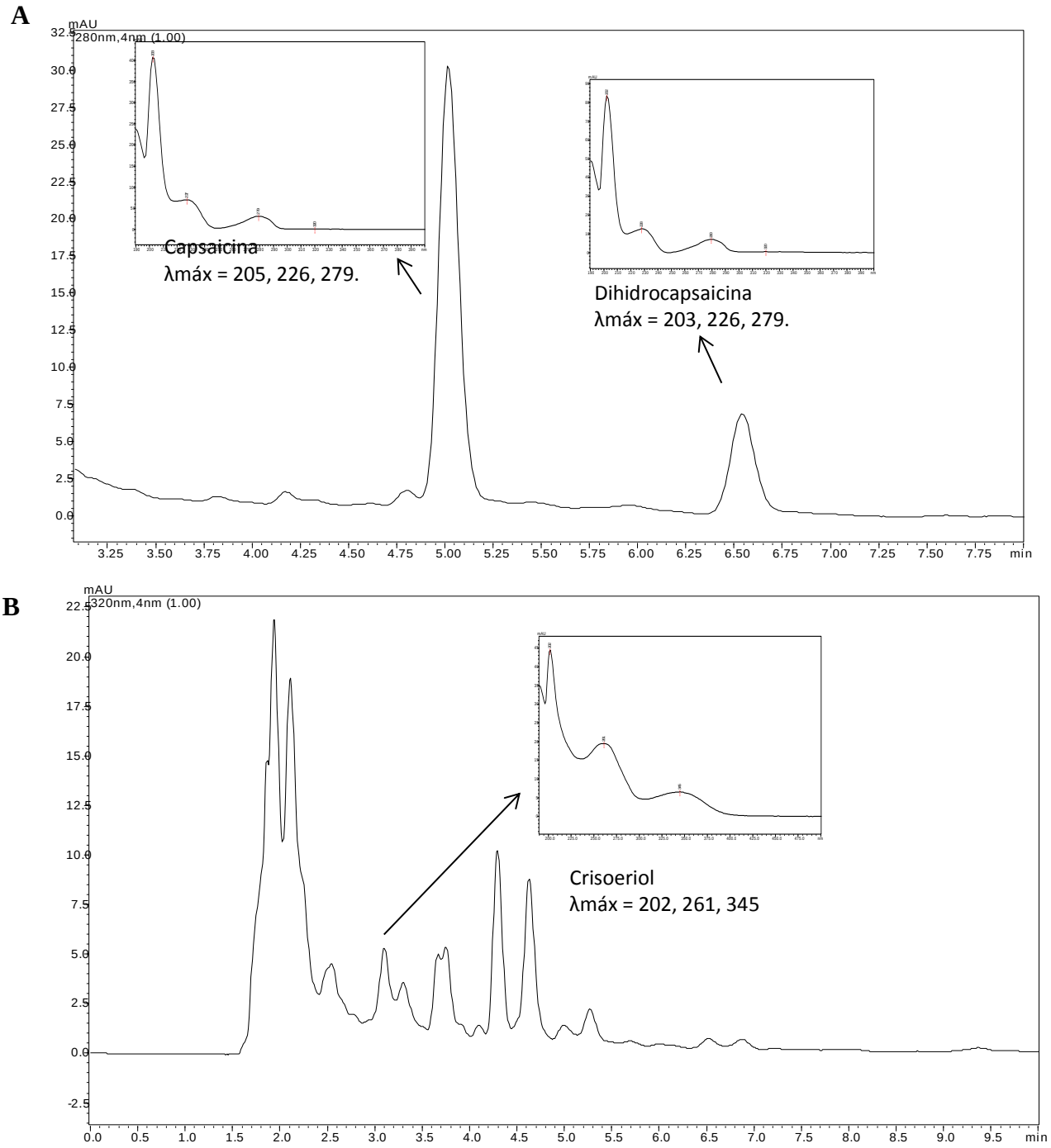


Figura 1. Cromatograma e espectro de UV (CLAE-DAD) do extrato etanólico de *C. frutescens*. (A) capsaicina e dihidrocapsaicina (280 nm), (B) Crisoeriol (320 nm).

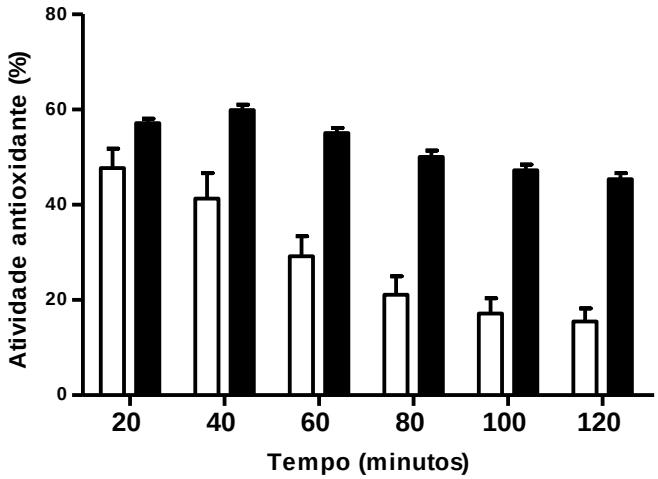


Figura 2. Atividade antioxidante do extrato etanólico de *C. frutescens* determinada por meio do teste β-caroteno/ácido linoleico. Colunas pretas – Trolox (16 µg/ml); Colunas brancas – extrato etanólico de *C. frutescens* (50 µg/ml).

Tabela 1. Atividade antiradicalar ($DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$) e teor de fenólicos totais do extrato etanólico de *C. frutescens.*

Fenólicos Totais (mg EAG/g extrato ± DP)	**EC_{50} ABTS μg/mL ± DP**		**EC_{50} DPPH μg/mL ± DP**	
Extrato Etanólico	Extrato Etanólico	Trolox	Extrato Etanólico	Ácido Ascórbico
9,1±0,07	82,6±0,19	2,9±0,05	302,3±3,97	3,3±0,02

Tabela 2. Teor de fenólicos de várias espécies de *Capsicum*.

Autores	Espécies	Solventes da Extração	Teor de Fenólicos
Alvarez-Parrilla et al., 2011	*C. annuum*	Metanol	1,0 mg EAG/g extrato
Hassimoto et al., 2005	*C. annuum*	Metanol	1,3 mg EAG/g extrato
Howard et al., 2000	*C. annuum*	Metanol	5,7 mg EAC/g extrato
	C. frutescens		5,1 mg EAC/g extrato
	C. chinense		4,3 mg EAC/g extrato
Isabelle et al., 2010	*C. annuum*	Solução de Acetona,água e ácido acético (70:29.5:0.5)	2,7 mg EAG/g extrato
Menichini et al., 2009	*C. chinense*	Etanol	7,5 mg EAG/g extrato
Oboh et al., 2007	*C. annuum*	Água	2,1 mg EAG/g extrato
	C. chinense		1,0 mg EAG/g extrato
Ranilla et al., 2010	*C. chinense*	Água	17 mg EAG/g extrato
	C. annuum		
	C. baccatum		10-12 mg EAG/g extrato
	C. pubescens		
Zhuang et al., 2012	*C. frutescens*	Etanol	4,9mg EAG/g extrato
	C. annuum		3,8 mg EAG/g extrato

EAG/g extrato – Equivalente ácido gálico/g extrato; EAC – Equivalente ácido clorogênico/g extrato.

Tabela 3. Concentrações de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol no extrato etanólico de *C. frutescens* (mg/g extrato ± DP).

Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Crisoeriol
9,2 ± 0,03	4,0 ± 0,02	2,1 ± 1,24

Tabela 4. Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de *C. frutescens* (mg/mL).

Micro-organismos	Concentrações
Bacterias Gram positivas	
Enterococcus faecalis	**5**
Bacillus subtillis	**5**
Staphylococcus aureus	**5**
Bacterias Gram negativas	
Escherichia coli	**10**
Klebsiella pneumoniae	**10**
Pseudomonas aeruginosa	**25**
Levedura	
Candida albicans	**5**

Capítulo 2

Artigo a ser submetido à revista Food Chemistry

Propriedades antioxidante e antimicrobiana de compostos isolados de *Capsicum frutescens*

Patrícia L. A. do Nascimento[1], Talita C. E. S. Nascimento[1], Natália S. M. Ramos[2], Girliane R. da Silva [2], Celso Amorim Camara[2], Keila A. Moreira[1,3], Ana L. F. Porto[1], Tania M. S. Silva[2]*

[1] Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil.

[2] Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil.

[3] Unidade Acadêmica de Garanhuns- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns- Pernambuco, CEP 55292-270, Brasil.

***Autor para correspondência:** Tania M. Sarmento Silva

Tel.: +55 8133206382

E-mail address: taniasarmento@dcm.ufrpe.br

Resumo

O conteúdo de fenólicos totais, capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol, a atividade frente aos radicais livres $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$, a capacidade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico e atividade antimicrobiana da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) foram investigados. Nos extratos hexânico e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens* foram encontrados conteúdo fenólico total variando de 3,2 - 110,6 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato. De acordo com a análise em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), o conteúdo de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol encontrados foram 164,3, 73,6 e 11,4 mg/g extrato, respectivamente. A capsaicina e dihidrocapsaicina mostraram atividade antioxidante semelhante aos padrões. Entre os extratos, frutos inteiros acetonitrila demonstraram uma excelente atividade antiradicalar com EC_{50} de 24,3 µg/mL frente o $ABTS^{\bullet+}$ e 105,1 µg/mL para o $DPPH^{\bullet}$. O mesmo extrato foi mais eficaz na prevenção da oxidação do β-caroteno (66,4%). O crisoeriol apresentou a menor concentração (0,06 µg/mL) para inibir a maioria dos micro-organismos. Este estudo demonstrou a notável atividade antioxidante e antimicrobiana de *C. frutescens*.

Palavras-chave: *Capsicum frutescens*, antioxidantes, antimicrobianos, crisoeriol, capsaicina, dihidrocapsaicina.

Abstract

Total phenolic, capsaicin, dihydrocapsaicin and chrysoeriol content, the radical scavenging activity by DPPH and ABTS tests, antioxidant capacity by β-carotene bleaching test and antimicrobial activity of malagueta pepper (*Capsicum frutescens)* were investigated. At hexanic and acetonitrile extract of *C. frutescens* seeds, peels and whole fruits were found total phenolic content ranging from 3.2 to 110.6 mg gallic acid equivalents/g extract. According to HPLC-DAD analysis, capsaicin, dihydrocapsaicin and chrysoeriol content found were 164.3, 73.6 and 11.4 $mg.g^{-1}$ extract respectively. Capsaicin and dihydrocapsaicin showed antioxidant activity similar to standards. Among extracts, whole fruits acetonitrile demonstrated the strongest radical scavenging with EC_{50} value of 24.3 $\mu g.mL^{-1}$ on $ABTS^{\bullet+}$ and 105.1 $\mu g.mL^{-1}$ on $DPPH^{\bullet}$. The same extract was more effective in preventing β-carotene oxidation (66.4%). Chrysoeriol showed the lowest concentration to inhibit the majority of micro-organisms. This study demonstrated the remarkable antioxidant and antimicrobial activity of *C. frutescens.*

Keywords: *Capsicum frutescens*, antioxidant, antimicrobial, chrysoeriol, capsaicin, dihydrocapsaicin.

1. Introdução

O gênero *Capsicum* originário de zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul, pertencente à família Solanaceae e inclui pimentas de importante valor econômico. Existem várias espécie *Capsicum* das quais três são amplamente difundidas e têm fruto quente ou pungente: *Capsicum annuum, Capsicum frutescens* e *Capsicum chinense* (Menichini et al., 2009). O maior número de espécies está concentrado no Brasil (Barboza & Bianchetti, 2005) e uma das mais consumidas é conhecida como "pimenta malagueta".

O composto que é o principal responsável pela pungência é a capsaicina (8-metil-*N*-vanilil-*trans*-6-nonenamida) e um grupo de substâncias semelhantes chamadas capsaicinoides, que inclui dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina que são responsáveis por mais de 90% da pungência do fruto *Capsicum* (Garcés-Claver, Arnedo-Andrés, Abadía, Gil-Ortega, e Álvarez-Fernández, 2006; Cisneros-Pineda, Torres-Tapia, Gutiérrez-Pacheco, Contreras-Martín, González-Estrada, e Peraza-Sánchez, 2007).

Há alguns anos é relatado que o consumo de certos alimentos e temperos como pimentas pode ter efeito satisfatório sobre a saúde. Pimentas são conhecidas por serem boas fontes de diferentes fitoquímicos, incluindo a vitamina C, compostos fenólicos, flavonoides, e carotenoides (Alvarez-Parrilla, La Rosa, Amarowicz, & Shahidi, 2011). Entre os compostos, os flavonoides são fitoquímicos sempre presentes em plantas e com atividades potencialmente exploráveis, incluindo atividade antimicrobiana direta, sinergismo com antibióticos e remoção de virulência bacteriana (Cushnie & Cordeiro, 2011). Uma vez absorvido, influenciam em várias funções biológicas, incluindo a síntese de proteínas, a angiogênese, a proliferação e diferenciação celular, proporcionando benefícios em uma variedade de doenças

humanas (Peterson & Dwyer, 1998). Os flavonoides encontrados na maioria das pimentas são glicosídeos e agliconas de miricetina, quercetina, luteolina, apigenina, e canferol (Bae, Jayaprakasha, Jifon, & Patil, 2012).

No que diz respeito as suas atividades biofuncionais, capsaicinoides são usados para a dor de artrite, apresentam efeitos anticancerígeno, e contra níveis elevados de colesterol, obesidade e produzem um grande número de efeitos fisiológicos e farmacológicos no trato gastrointestinal, sistema cardiovascular e respiratório, bem como os sistemas sensoriais e termorregulação (Othman, Ahmed, Habila, & Ghafar, 2011). A capsaicina também possui propriedades antimicrobianas que abrem portas para explorar o seu potencial como um inibidor natural de micro-organismos patogênicos em alimentos (Dorantes, Colmenero, Hernandez, Mota, e Jaramillo, 2000).

Propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de muitas plantas são de grande interesse no meio acadêmico e da indústria de alimentos, já que seu possível uso como aditivos naturais surgiu de uma tendência crescente para substituir os antioxidantes sintéticos por naturais (Sokmen et al., 2004). O stress oxidativo desempenha papel importante em várias doenças, como o câncer, artrite reumatoide, asma, diabetes e as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, incluindo a aterosclerose, a doença de Alzheimer, e outras doenças degenerativas relacionadas com a idade, que mostram uma elevada prevalência a nível mundial (Zimmer, Leonardi , Miron, Schapoval, Oliveira & Gosmann, 2012). Produtos naturais assim como compostos puros ou extratos de plantas padronizados, oferecem oportunidades ilimitadas para levar a novas drogas por causa da disponibilidade de inigualável diversidade química (Cos, Vlietinck, Berghe, e Maes, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos hexânico, acetonitrila e compostos isolados de pimenta malagueta (*C. frutescens*).

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos e solventes

Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. Capsaicina, β-caroteno, 1,1'-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido linoleico, ácido 6-hidroxi-2 ,5,7,8-tetrametilcroman ácido-2-carboxílico (Trolox), persulfato de potássio, 2,2 '-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2 Material vegetal

Os frutos maduros de *C. frutescens* utilizados neste estudo foram adquiridos de um mercado local (Central de Abastecimento de Pernambuco- CEASA). Apenas frutos inteiros e maduros foram utilizados e os cálices e pedicelos foram removidos manualmente.

2.3 Procedimentos de extração e isolamento de capsaicina, dihidrocapsaicina crisoeriol

Frutos de *C. frutescens* (2,78 kg) foram secos numa estufa com circulação de ar (50 °C) durante 24 horas, e triturados a pó. A amostra seca (1,9 kg) foi extraída inicialmente em hexano (três repetições) e, em seguida, em acetonitrila (cinco repetições). Todas as extrações foram realizadas em frascos de vidro com tampa de rosca e mantidos em ultrassom Ultra Cleaner 1400 (Unique, Indaiatuba, Brasil), durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 ± 1 °C. O extrato de acetonitrila foi solubilizado com metanol e injetado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu

Corp Kyoto, Japão) equipado com coluna preparativa Luna C_{18} com 250 x 21,20 milímetros x 5µm e pré-coluna Luna C_{18} coluna 21 mm (Phenomenex, Califórnia, EUA). A fase móvel foi metanol/água na proporção de 70:30, taxa de fluxo de 15 mL/min, o volume de injeção foi de 500 µL. O detector era um conjunto de diodos (DAD) SPD-M20A Prominence (Shimadzu Corp Kyoto, Japão) e o tempo de corrida foi de 12 minutos de duração com a temperatura do forno de 40 °C. O metanol foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 ± 1 °C. Após a remoção do metanol, os compostos isolados foram submetidos a extração com acetato de etila ou diclorometano. A identificação do flavonoide crisoeriol foi realizada por ressonância magnética nuclear em espectrômetro Bruker DPX-300 (Bruker, Alemanha), utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO) como referência interna.

2.4 Procedimentos de extração para quantificação de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol

Frutos de *Capsicum frutescens* (1 kg) foram secos em estufa com circulação de ar (50 °C) durante 24 horas. Para quantificação foram utilizadas sementes, cascas e frutos inteiros. Cada uma destas partes foi triturada em pó separadamente. Um grama de cada parte foi sujeita inicialmente à extração em hexano (três repetições) e, em seguida, acetonitrila (cinco repetições). Todas as extrações foram realizadas em frascos de vidro com tampa de rosca e mantidos em ultrassom Ultra Cleaner 1400 (Unique, Indaiatuba, Brasil), durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida a 40 ± 1°C em evaporador rotativo e armazenados a -20 °C até serem analisadas.

2.5 Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do conteúdo fenólico total presente nos extratos hexânicos e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens* foi realizada pelo

método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977) com modificações, utilizando ácido gálico como padrão.

Inicialmente, a 300 µL da solução de cada extrato (1 mg/mL) foram adicionados 60 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 2460 µL de água destilada, sob agitação, durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionados à mistura 180 µL de carbonato de sódio (2% p/v) e agitado durante 30 segundos, resultando amostras com uma concentração final de 100 µg/mL. Após duas horas de incubação, a absorbância das amostras foi estimada por espectrofotometria, medida em comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG/g) do extrato.

2.6 Determinação do teor de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol

Capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol foram quantificadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com Collins, Wasmund e Bosland, (1995) com algumas modificações. O sistema consistia em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A (Shimadzu Corp Kyoto, Japan). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C-18 5µ 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm, Phenomenex, Califórnia, EUA). O sistema foi eluído com metanol/água numa proporção de 73:23 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, tempo de corrida de 7 minutos e a temperatura do forno de 40°C. O comprimento de onda de 280 nm foi utilizado para a monitoração. A concentração injetada dos extratos foi 3 mg/mL. A curva de calibração foi realizada nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL com os padrões de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol.

2.7 Atividade antiradicalar frente o radical livre DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres nas amostras foi determinada utilizando o método espectrofotométrico DPPH. Este método é frequentemente usado para determinar a capacidade das espécies de plantas na captura de radicais livres (Silva et al., 2006).

Soluções estoques de capsaicina, dihidrocapsaicina e extratos hexânico e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens* foram preparados a 1,0 mg/mL. Quantidades apropriadas da solução etanólica de $DPPH^{\bullet}$ (23,6 µg/mL) foram adicionadas às amostras a fim de obter concentrações finais que variam de 20 - 320 µg/mL para os extratos, a capsaicina (5 - 80 µg/mL) e dihidrocapsaicina (20 - 200 µg/mL). A absorbância foi mensurada a um comprimento de onda de 517 nm, após um período de incubação de 30 minutos em ultrassom, no abrigo da luz. Os resultados foram expressos através da CE_{50} ± D.P., que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH. O ácido ascórbico foi utilizado como composto padrão.

2.8 Atividade antiradicalar frente o radical livre ABTS

Este teste envolve a geração do cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ por oxidação de ABTS [2,2 '-azinobis-(3-etil-benzothialolina-6-sulfónico)] com o persulfato de potássio e foi realizada de acordo com a Re, Pellegrini, Proteggente , Pannala, Yang e Rice-Evans (1999) com modificações. O cátion radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) foi produzido por reação da solução de ABTS (7 mM), com 2,45 mM de persulfato de potássio e deixando a mistura em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da utilização. Em seguida, a solução $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente), até uma absorbância de 0,7 ± 0,05 nm. As soluções de amostras foram preparadas com uma concentração de 1,0 mg/mL. Quantidade apropriada de

$ABTS^{\bullet+}$ (2700 µL) foi adicionado às amostras para se obter concentrações finais que variaram de 5 a 500 µg/mL para os extratos, para a capsaicina (0,5 - 10 µg/mL) e para a dihidrocapsaicina (20 - 200 µg/mL). Os frascos foram mantidos no escuro em ultrassom, e após 10 minutos, a absorbância das amostras foram medidas em 734 nm. Trolox (0,1 mg/mL) foi utilizado como controle positivo.

2.9 Teste antioxidante do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o teste de β-caroteno/ácido linoleico de acordo com a Bamoniri, Ebrahimabadi, Mazoochi, Behpour, Kashi e Batooli (2010) com modificações. A solução de β-caroteno/ácido linoleico foi preparada por adição de uma alíquota de 150 µL de solução de β-caroteno (20 mg/mL, em clorofórmio), com 160 µL de ácido linoleico e 660 µL de Tween 20, depois foram adicionados 140 mL de água destilada saturada com oxigênio (30 min). A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,6 e 0,7 nm no comprimento de onda de 470 nm. Alíquotas de amostras com concentrações que variaram de 50 a 100 µg/mL para os extratos, para capsaicina (50 µg/mL) e dihidrocapsaicina (50 µg/mL), foram comparados com o controle (sem antioxidante) e o Trolox (200 µg/mL) usado como antioxidante padrão. As absorbâncias de todas as amostras foram tomadas no tempo zero e a mensuração da absorbância foi mantida durante 120 minutos, em intervalos de 20 minutos. A capacidade antioxidante foi expressa como percentagem de inibição da oxidação.

2.10 Atividade antimicrobiana

2.10.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo incluem *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396),

Staphylococcus aureus (UFPEDA 02) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007), foram fornecidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), Brasil.

2.10.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio de microdiluição foi realizado de acordo com métodos de referência do CLSI M7 A6 para bactérias (Clinical Laboratory Standards Institute, 2003) e M27 A3 para leveduras (Clinical Laboratory Standards Institute, 2008). Foram utilizadas microplacas de 96 poços para se obter o valor de CIM da capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol isolados de *C. frutescens* frente os micro-organismos testados. As concentrações dos compostos preparados em DMSO variaram de 0,03 a 100 µg/mL (p/v). A CIM foi determinada por mensuração de cada poço com leitora de microplacas (ASYS UVM 340, Cambridge, UK) e a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento bacteriano em comparação com a densidade óptica do crescimento dos controles. Cloranfenicol (50 µg/mL) foi utilizado como controle positivo para todas as cepas bacterianas e itraconazol (25 µg/mL) para a levedura.

2.11 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± DP (desvio padrão). A concentração que promoveu 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada por regressão linear com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram realizados ANOVA simples e bifatorial, assim como pós-testes de Bonferroni ($p<0,05$) e de Tukey foram feitos para avaliar as diferenças da média entre os grupos ($p<0,05$). O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi usado para expressar correlações entre o teor de fenólicos totais, DPPH e ABTS.

3. Resultados e discussão

Inicialmente, os extratos hexânico e acetonitrila obtidos a partir das sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens* foram avaliados. A partir de 1 kg destes frutos obteve-se 176 mg e 38 mg de extrato hexânico e acetonitrila de sementes, 306 mg e 58 mg de extrato hexânico e acetonitrila de casca, e para os frutos inteiros foram obtidos 318 mg e 46 mg de extrato hexânico e acetonitrila, respectivamente.

3.1 Conteúdo fitoquímico

O teor de fenólicos, flavonoides e capsaicinoides nos extratos hexânico e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens* são apresentados na Tabela 1. O teor de fenólicos variou entre 3,2 ± 0,22 e 110,6 ± 1,03 mg EAG/g de extrato. Os resultados mostraram um maior teor de fenólicos no extrato acetonitrila de frutos inteiros, no entanto Howard, Talcott, Brenes e Villalon (2000) e Zhuang, Chen, Sun e Cao (2012) encontraram 5,1 e 4,9 mg EAG/g para frutos de *C. frutescens*, teores mais baixos do que o apresentados, que poderiam ser causados por diferentes cultivares e condições de crescimento. As sementes apresentaram 61,31 ± 0,64 mg EAG/g, enquanto que nas cascas foi encontrado um teor de 14,0 ± 0,14 mg EAG/g extrato. Oboh e Ogunruko, (2010) afirmaram existir um maior teor de fenólicos no pericarpo dos frutos de *C. frutescens* quando comparado com as sementes, contrariando nossos achados. A este respeito, os resultados podem sugerir de acordo com os teores relatados em estudos prévios que a acetonitrila utilizada neste estudo foi capaz de extrair maior proporção de compostos fenólicos de *C. frutescens* do que os solventes hexano, etanol e metanol utilizados em outros estudos.

Chinn, Sharma-Shivappa e Cotter, (2011) afirmaram que a escolha do solvente deve levar em consideração a solubilidade dos pigmentos que podem dificultar os passos das purificações subsequentes, e afirmam que a extração sólido-líquida com

solventes tais como hexano, clorofórmio e etanol é o método mais comumente empregado para a recuperação da capsaicina. Neste estudo foram utilizados inicialmente hexano devido sua baixa polaridade para remover a porção de óleo e depois acetonitrila para extrair os compostos fitoquímicos mais facilmente e isolou-se 1.184 mg de capsaicina, 778 mg de dihidrocapsaicina e 36 mg de crisoeriol. A dihidrocapsaicina e crisoeriol isolados em CLAE foram utilizados como padrões para a quantificação. Bae et al. (2012) extraindo *C. annuum* com hexano obtiveram as quantidades máximas de capsaicina e dihidrocapsaicina variando respectivamente 0,03-2,4 mg/g e 0,01 a 1,0 mg/g, que são mais baixas do que as mostradas na Tabela 1. Com relação aos resultados expostos na referida tabela, observou-se que a acetonitrila extraiu a maior quantidade de compostos de acordo com o estudo anterior de Collins et al., (1995). Os extratos acetonitrila de cascas apresentaram as maiores concentrações de capsaicina entre as partes avaliadas (164,3 ± 10,84 mg/g de extrato). Vários autores avaliaram o conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina em pimentas de várias espécies do gênero *Capsicum*, além de diferentes técnicas e solventes utilizados para a extração de constituintes químicos de pimentas. Os conteúdos encontrados neste estudo foram maiores do que os relatados em estudos anteriores (Tabela 2). A quantidade de capsaicina de uma determinada espécie pode variar em função da intensidade da luz e da temperatura à qual a planta é cultivada, a idade da fruta, e a posição do fruto na planta (Othman et al., 2011). Cisneros-Pineda et al., (2007) observaram que a biossíntese de capsaicinoides ocorre na placenta, onde as células epidérmicas especializadas acumulam nos vacúolos e excretam na semente e superfície interna do pericarpo, por isso eles são acumulados preferencialmente na placenta e não no pericarpo. O que difere dos nossos resultados que apresentaram maiores teores nas cascas. Uma explicação

provável para os nossos resultados pode ser que a presença de capsaicinoides no pericarpo sugere que os capsaicinoides são translocados do tecido da placenta ao pericarpo através das paredes das células da camada epidérmica da placenta (Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, Bino, & Bovy, 2011).

Os capsaicinoides não estão distribuídos uniformemente no fruto, talvez, o menor teor de capsaicina recuperado dos frutos inteiros tenha sido devido a diminuição de conteúdo dos capsaicinoides quando as células foram rompidas (Kirschbaum-Titze, Hiepler, Mueller-Seitz, & Petz, 2002). Ao separar as sementes dos frutos, a placenta ficou junto com a casca, isso se justifica os níveis mais elevados de capsaicinoides nesta parte. As sementes tiveram o segundo maior nível (130,4 mg/g), muito provavelmente devido a proximidade das sementes com o tecido placentário onde os capsaicinoides são produzidos (Chinn, Sharma-Shivappa & Cotter, 2011).

Frutos maduros de *C. annuum* e *C. frutescens* são sensivelmente mais elevados em flavonoides totais do que os de *C. chinense* (Howard et al., 2000). No trabalho de Marín, Ferreres, Tomás-Barberán, & Gil, (2004) foi mostrado que os compostos fenólicos em pimentão estavam localizados principalmente na casca. Eles caracterizaram 23 flavonoides do pericarpo de pimentão, incluindo crisoeriol. No nosso estudo, o teor de crisoeriol foi maior nas sementes acetonitrila (11,4 mg/g de extrato), do que nas cascas. Howard et al., (2000) e Zhuang et al., (2012) analisando a concentração de luteolina em *C. frutescens* encontraram 0,03 mg/g e de 0,8 mg/g, respectivamente. Por outro lado, a concentração mais baixa apresentado neste estudo foi encontrada no fruto inteiro hexânico (0,4 ± 0,03 mg/g).

Peterson e Dwyer, (1998) propuseram uma escala de classificação botânica para a concentração de flavonoides nos alimentos: baixa (0,1-39,9 mg/kg), moderada (40-99,9 mg/kg) e alta (> 100 mg/kg). A partir desta escala, os nossos resultados

mostraram elevada concentração de crisoeriol para todas as amostras testadas (0,4 - 11,4 mg/g de extrato). No entanto, a variação quantitativa de flavonoides de pimenta ocorre por diferentes processos de extração, tais como o solvente utilizado na extração, a proporção deste na amostra, e o tempo de extração (Bae et al., 2012).

3.2 Atividade antiradicalar e antioxidante

Uma variedade de testes que expressam potencial antioxidante dos componentes dos alimentos tem sido sugerida. Estes podem ser classificados em dois grupos: os ensaios para a capacidade de eliminação de radicais e ensaios que testam a capacidade de inibir a oxidação dos lipídeos em condições aceleradas. Além disso, a atividade sequestradora de radicais é um dos vários mecanismos que contribuem para uma atividade geral, criando assim um efeito sinérgico (Sokmen et al., 2004).

Um método comumente utilizado para verificar a capacidade antioxidante consiste em medir a capacidade dos extratos ou moléculas puras para eliminar o $DPPH^{\bullet}$. Os antioxidantes são capazes de reduzir radical DPPH de cor púrpura a cor amarela ao receber um elétron ou um átomo de hidrogênio, tornando-o estável (Bamoniri et al., 2010). Os efeitos de radicais livres e atividade antioxidante são demonstrados na Figura 1. Os extratos acetonitrila mostraram os menores valores de EC_{50} para os testes DPPH e ABTS, assim como a melhor atividade antioxidante quando comparados com os extratos hexânicos.

Neste estudo, todas as amostras foram capazes de reduzir o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) à difenilpicrilhidrazina de cor amarela com um EC_{50} variando 23,1-258,6 µg/mL. A capsaicina apresentou o menor valor de CE_{50} entre as amostras (23,1µg/mL) e o teste de Tukey não mostrou diferença estatisticamente significante entre capsaicina e ácido ascórbico ($p > 0,05$). Zhuang et al., (2012),

estudando a atividade antiradicalar de frutos de *C. frutescens* contra DPPH encontraram uma CE_{50} de 135,1 µg/mL, ou seja, mais alta do que o nosso melhor resultado para o fruto inteiro (105,1 µg/mL). Menichini et al., (2009) estudaram frutos de *C. chinense* encontraram CE_{50} de 287 µg/mL e Zimmer et al., (2012) analisando as sementes de *C. baccatum* acharam CE_{50} variando entre 229,72 e 819,67 µg/mL, ambos os valores mais elevados do que os encontrados neste estudo. A melhor CE_{50} de todas as amostras testadas foi a da capsaicina (23,1 µg/mL) por ser o valor mais próximo do ácido ascórbico; resultados de Zimmer et al., (2012) apontaram uma CE_{50} similar aos achados para a capsacina (17,62 µg/mL) neste estudo.

A atividade antiradicalar frente o ABTS mostrou valores de CE_{50} compreendidos entre 24,3 e 459,6 µg/mL (Figura 1). O extrato que apresentou menor CE_{50} foi o fruto de acetonitrila, seguido de cascas acetonitrila (53,3 µg/mL). A capsaicina teve a melhor concentração eficaz de todas as amostras testadas (3,9 µg/mL). Além disso, é interessante salientar que o teste de Tukey não apresentou diferença estatisticamente significante entre os resultados de capsaicina e Trolox ($p > 0,05$), o que evidencia a excelente ação antiradicalar da capsaicina.

O teste do β-caroteno/ácido linoleico avalia o efeito inibitório de um composto ou uma mistura da oxidação do β-caroteno na presença de oxigênio molecular (O_2). O ensaio dá uma estimativa do potencial antioxidante da amostra. Um antioxidante é uma substância que, quando presente em uma concentração significativamente baixa impede ou atrasa a oxidação de um substrato oxidável (Bamoniri et al., 2010).

Como apresentado na Figura 1, a atividade antioxidante em 60 minutos, a metade do tempo total do teste, mostrou a ação inibitória variando entre 15,4 e 66,4%. Os extratos acetonitrila de sementes e frutos inteiros apresentaram os melhores resultados (59,4 e 66,4%), maior do que o padrão Trolox (55,0 ± 1,09%), mas os

nossos resultados de capsaicina (51,1 ± 1,18%) e dihidrocapsaicina (54,2 ± 1,07%) também não diferiram estatisticamente do Trolox ($p > 0,05$). Comparando o conteúdo fenólico total (CFT), com a atividade antioxidante e atividades antiradicalares expressas por CE_{50}, eles mostraram a mesma tendência. Nos extratos com os maiores teores de fenólicos identificou-se maior atividade antiradicalar e melhor atividade antioxidante. A atividade antioxidante mais elevada (66,4%) e mais baixa CE_{50} frente DPPH (105,1 µg/mL) e ABTS (24,3 µg/mL) correspondem ao maior valor de CFT foi identificado nos frutos inteiros acetonitrila (110,6 mg EAG/g).

Realizou-se uma correlação linear entre os valores de conteúdo fenólico total, e os valores de DPPH, ABTS e atividade antioxidante com o sistema β-caroteno/ácido linoleico. O coeficiente de correlação de Pearson indicou que 94% da atividade antiradicalar exibida pelos extratos contra o radical $ABTS^{\bullet+}$ ($r = 0,9445$) e $DPPH^{\bullet}$ ($r = 0,9439$), assim como 88% da atividade antioxidante ($r = 0,8863$), podem ser atribuídos aos compostos fenólicos presentes nestas amostras. Segundo Chinn et al. (2011), a qualidade dos capsaicinoides extraídos, bem como a sua atividade antioxidante é afetada por parâmetros de processamento tais como a separação, a temperatura de extração e de secagem.

3.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima para os micro-organismos testados estão apresentados na Tabela 3. Pôde-se observar que os valores de CIM obtidos confirmam a existência de uma atividade significativa contra as cepas de bactérias testadas neste estudo, com valores de CIM variando entre 0,06 e 25 µg/mL. Nossos resultados mostraram que tanto as bactérias Gram

positivas quanto as Gram negativas foram afetadas pelos três compostos testados. Não foi identificada a CIM do crisoeriol para inibição da C. albicans.

A dihidrocapsaicina requer concentrações mais elevadas para inibir bactérias Gram negativas (2,5 - 5 µg/mL) do que as Gram positivas (0,6 - 5 µg/mL), resultados justificados pelo fato de que as bactérias Gram positivas podem ser mais susceptíveis, uma vez que tem apenas uma camada de peptideoglicano exterior, não sendo uma barreira efetiva de permeabilidade (Bamoniri et al., 2010). As concentrações mais elevadas inibem *Enterococcus faecalis, Bacillus subtillis* e *Pseudomonas aeruginosa* podem estar relacionadas com o fato de algumas bactérias utilizam a capsaicina como nutriente para o crescimento (Flagan & Leadbetter, 2006). Por conseguinte, os nossos resultados mostraram que dihidrocapsaicina possuem uma atividade antimicrobiana seletiva com base em diferenças de parede celular de bactérias. Neste estudo, o crescimento de *Candida albicans* foi inibido pela capsaicina e dihidrocapsaicina enfatizando que dihidrocapsaicina mostrou a menor CIM (10 µg/mL). O estudo de Molina-Torres, García-Chaves e Ramírez-Chávez, (1999) foram necessárias CIMs de 300 µg/mL e 25 µg/mL de capsaicina para inibir o crescimento de *E. coli* e *B. subtilis*. Nossos achados corroboram com os resultados deste estudo prévio para o *B. subtilis,* mas discordam sobre as observações para *E. coli*. Contrariando nossos resultados, Dorantes et al., (2000) não encontraram atividade antimicrobiana de capsaicina e dihidrocapsaicina contra *B. subtilis, S. aureus* e *C. albicans.*

Curiosamente, os nossos resultados mostram uma notável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas que vão 0,06 - 10 µg/mL. Cos e colaboradores, (2006) ressaltaram que, os extratos com CIMs ≤ 100 µg/mL e compostos isolados com CIMs ≤ 10 µg/mL são considerados muito eficientes (Cos et al., 2006). Estudos

recentes identificaram alguns flavonoides com CIMs tão baixas quanto 0,06 µg/mL (Cushnie & Lamb, 2011), semelhante ao nosso resultado. Deve-se notar que, entre os compostos isolados testados, o crisoeriol apresentou os menores valores de CIM. Curiosamente, os nossos resultados para esta substância mostraram atividade notável contra bactérias Gram negativas.

4. Conclusões

A acetonitrila foi responsável pelo elevado teor de compostos extraídos. O extrato acetonitrila de fruto inteiro apresentou o maior teor de fenólicos e a melhor atividade antioxidante entre os extratos. Com relação aos compostos isolados, tanto capsaicina e dihidrocapsaicina apresentaram baixos valores de EC_{50} e alta atividade antioxidante. Por outro lado, encontramos a melhor atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas com o crisoeriol. Estes achados sugerem que futuras investigações devem ser realizadas a fim de estudar sua atividade *in vivo*, a toxicidade, biodisponibilidade e, assim, determinar a sua aplicabilidade para animais e humanos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro; às centrais analíticas CENAPESQ, CENLAG e FACETEG pelo uso das instalações.

Referências

Alvarez-Parrilla, E., La Rosa, L. A., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 163-173.

Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., & Patil, B. S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis. *Food Chemistry*, 130, 751-758.

Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F. J., & Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran). *Food Chemistry*, 122, 553–558.

Barboza GE, Bianchetti LB (2005). Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. *Systematic Botany,* 30, 863-871.

Chinn, M. S., Sharma-Shivappa, R. R., & Cotter, J.L. (2011). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 340–345.

Cisneros-Pineda, O., Torres-Tapia, L. W., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Contreras-Martín, F., González-Estrada, T., & Peraza-Sánchez, S. R. (2007). Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 104, 1755-1760.

Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. (2008). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 3rd. ed. Wayne, PA: CLSI; M27-A3.

Clinical and Laboratory Standarts Institute. CLSI. (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; M7-A6.

Collins, M. D., Wasmund, L. M., & Bosland, P. W. (1995). Improved Method for Quantifying Capsaicinoids in *Capsicum* Using High-performance Liquid Chromatography. *Hortscience*, 30, 137–139.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 290-302.

Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107.

Dorantes , L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernandez, E., & Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57,125–128.

Flagan, S. F., & Leadbetter, J. R. (2006). Utilization of capsaicin and vanillylamine as growth substrates by *Capsicum* (hot pepper) – associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 8, 560-565.

Garcés-Claver, A., Arnedo-Andrés, M. S., Abadia, J., Gil-Ortega, R., & Álvarez-Fernández, A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography- Electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54, 9303-9311.

Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., & Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1713– 1720.

Kirschbaum- Titze, P., Hiepler, C., Mueller-Seitz, E., & Petz, M. (2002). Pungency in paprika (Capsicum annuum). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1260-1263.

Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. (2004). Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3861−3869.

Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J., & Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical contente and biological activity of *Capsicum Chinese* Jacq. Cv Habanero. *Food Chemistry*, 114, 553-560.

Molina-Torres, J., García-Chávez, A., & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 24-248.

Oboh, G., & Ogunruku, O. O. (2010). Cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain: Protective effect of hot short pepper (*Capsicum frutescens* L. var. *abbreviatum*). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 227–233.

Othman, Z. A. A., Ahmed, Y. B. H., Habila, M. A., & Ghafar, A. A. (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*. 16, 8919-8929.

Peña-Alvarez, A., Ramírez-Maya, E., & Alvarado-Suárez, L. A. (2009). Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2843–2847.

Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *Journal of the American Dietetic Association*, 98, 677-685.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 11231-1237.

Silva, T. M. S., Câmara, C. A., Lins, A. C. S., Barbosa, J. M., Silva, E. M. S., Freitas, B. M., & Santos, F. A. R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging

activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511.

Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.

Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., & Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius. *Food Control*, 15, 627-634.

Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R.J., & Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72, 1358-1370.

Zhuang, Y., Chen, L., Sun, L., & Cao, J. (2012). Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *Journal of Functional Foods*, 4, 331–338.

Zimmer, A. R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J. R., & Gosmann, G. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory proprerties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology,* 139, 228-233.

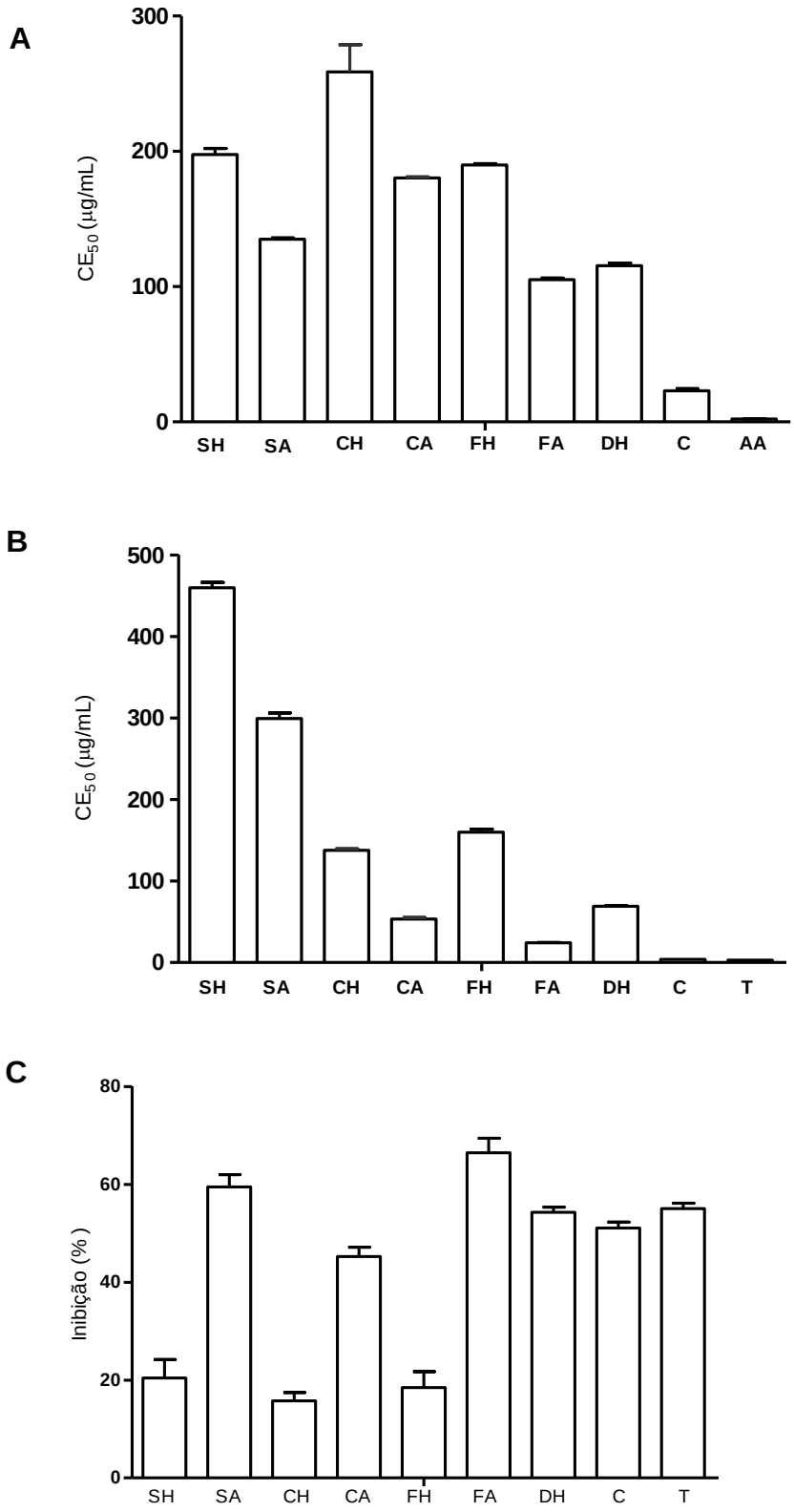


Figura 1. Efeitos dos extratos hexânico e acetonitrila de *C. frutescens,* capsaicina e dihidrocapsaicina sobre radical DPPH (A), radical ABTS (B) e ensaio β-caroteno/ ácido linoleico em 60 minutos (C). SH: semente hexânica, SA: semente acetonitrila, CH: casca hexânica, CA: casca acetonitrila, FH: fruto inteiro hexânico, FA: fruto inteiro acetonitrila, DH: dihidrocapsaicina, C: capsaicina, AA: ácido ascórbico e T: Trolox.

Tabela 1. Conteúdo de fitoquímicos nos extratos hexânico e acetonitrila de sementes, cascas e frutos inteiros de *C. frutescens.*

	Fenólicos (mg EAG/g de extrato ± DP)	**Capsaicina** (mg/g extrato ± DP)	**Dihidrocapsaicina** (mg/g extrato ± DP)	**Crisoeriol** (mg/g extrato ± DP)
Semente Hexânica	9,4 ± 0,55	90,0 ± 8,60	42,0 ± 4,21	1,8 ± 0,69
Semente Acetonitrila	61,3 ± 0,64	130,4 ± 4,98	53,3 ± 1,59	11,4 ± 0,38
Casca Hexânica	3,2 ± 0,22	45,8 ± 0,1	23,3 ± 0,23	0,5 ± 0,27
Casca Acetonitrila	14,0 ± 0,14	164,3 ± 10,84	73,6 ± 6,43	5,1 ± 1,31
Fruto inteiro Hexânico	4,9 ± 0,44	31,1 ± 2,04	15,0 ± 0,65	0,4 ± 0,03
Fruto inteiro Acetonitrila	110,6 ± 1,03	109,8 ± 13,66	42,0 ± 4,64	5,5 ± 0,49

Valores representam médias (n=3) ± DP.

Tabela 2. Conteúdo de capsaicina e dihidrocapsaicina de várias espécies de *Capsicum*.

Espécies	Solvente para extração	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Autores
C. frutescens	Etanol	0,7 mg/g peso fresco	0,4 mg/g peso fresco	Zhuang et al., (2012)
C. annuum	Metanol	2,3 mg/g extrato	0,8 mg/g extrato	Alvarez-Parrilla et al., (2011)
C. annuum	Etanol	0,3 mg/g extrato	0,2 mg/g extrato	Othman et al., (2011)
C. chinense (Seeds)	Acetonitrila	14,0 mg/g frutos secos	5,2 mg/g frutos secos	Chinn et al., (2011)
C. chinense (Shells)		5,0 mg/g frutos secos	1,3 mg/g frutos secos	
C. chinense (Whole fruits)		7,0 mg/g frutos secos	2,0 mg/g frutos secos	
C. frutescens (Seeds)	Metanol	1,1 mg/g peso fresco	0,5 mg/g peso fresco	Wahyuni et al., (2011)
C. frutescens (Pericarp)		0,6 mg/g peso fresco	0,1 mg/g peso fresco	
C. chinense	Etanol	25,4 mg/g fruto seco	4,5 mg/g fruto seco	Peña-Alvarez, et al., (2009)
C. chinense	Etanol	4,3 mg/g peso fresco	2,4 mg/g peso fresco	Menichini et al., (2009)
C. frutescens	Acetonitrila	3,7 mg/g peso seco	2,4 mg/g peso seco	Garcés-Claver et al., (2006)

Tabela 3. Concentração inibitória mínima de capsaicina, dihidrocapsaicina e crisoeriol.

	Concentrações (µg/mL)		
Micro-organismos	**Capsaicina**	**Dihidrocapsaicina**	**Crisoeriol**
Bactérias Gram positivas			
Enterococcus faecalis	**25**	**0,6**	**1**
Bacillus subtillis	**25**	**1,2**	**1**
Staphylococcus aureus	**1,2**	**5**	**0,25**
Bactérias Gram negativas			
Pseudomonas aeruginosa	**10**	**2,5**	**0,12**
Klebsiella pneumoniae	**0,6**	**2,5**	**0,25**
Escherichia coli	**5**	**5**	**0,06**
Levedura			
Candida albicans	**25**	**10**	**ND***

*ND- não detectada

Considerações finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As sementes apresentaram o maior teor de capsaicina entre as partes analisadas.

- As amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana frente a maioria dos micro-organismos testados.

- O crisoeriol necessitou das menores concentrações para inibir o crescimento das bactérias Gram negativas.

- O fruto acetonitrila apresentou o maior teor de fenólicos totais.

- Entre os extratos, boa parte da atividade antiradicalar e antioxidante está relacionada ao teor de fenólicos.

- A capsaicina apresentou a maior atividade sequestradora dos radicais DPPH e ABTS e maior potencial antioxidante.

Anexos

Anexo 1 – Normas de publicação da revista African Journal of Microbiology Research

African Journal of Microbiology Research

Instructions for Authors

The African Journal of Microbiology Research (ISSN 1996-0808, IMPACT FACTOR 0.533) is an open access journal that provides rapid publication (weekly) of articles in all areas of Microbiology such as Environmental Microbiology, Clinical Microbiology, Immunology, Viriology, Bacteriology, Phycology, Mycology and Parasitology, Protozoology, Microbial Ecology, Probiotics and Prebiotics, Molecular Microbiology, Biotechnology, Food Microbiology, Industrial Microbiology, Cell Physiology, Environmental Biotechnology, Genetics, Enzymology, Molecular and Cellular Biology, Plant Pathology, Entomology, Biomedical Sciences, Botany and Plant Sciences, Soil and Environmental Sciences, Zoology, Endocrinology, Toxicology. The Journal welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and scientific excellence. Papers will be published shortly after acceptance. All articles are peer-reviewed.

Electronic submission of manuscripts is strongly encouraged, provided that the text, tables, and figures are included in a single Microsoft Word file (preferably in Arial font).

Submit manuscripts as e-mail attachment to the Editorial Office at: ajmr@acadjournals.org. A manuscript number will be mailed to the corresponding author shortly after submission.

The **cover letter** should include the corresponding author's full address and telephone/fax numbers and should be in an e-mail message sent to the Editor, with the file, whose name should begin with the first author's surname, as an attachment.

The African Journal of Microbiology Research will only accept manuscripts submitted as e-mail attachments.

Article Types

Three types of manuscripts may be submitted:

Regular articles: These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications: A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new models or hypotheses, gene isolation and identification, innovative methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are 2 to 4 printed pages (about 6 to 12 manuscript pages) in length.

Reviews: Submissions of reviews and perspectives covering topics of current interest are welcome and encouraged. Reviews should be concise and no longer than 4-6 printed pages (about 12 to 18 manuscript pages). Reviews are also peer-reviewed.

Review Process

All manuscripts are reviewed by an editor and members of the Editorial Board or qualified outside reviewers. Authors cannot nominate reviewers. Only reviewers randomly selected from our database with specialization

in the subject area will be contacted to evaluate the manuscripts. The process will be blind review.

Decisions will be made as rapidly as possible, and the journal strives to return reviewers' comments to authors as soon as possible. The editorial board will re-review manuscripts that are accepted pending revision. It is the goal of the AJMR to publish manuscripts shortly after submission.

Regular articles

All portions of the manuscript must be typed **double-spaced** and all pages numbered starting from the title page.

The **Title** should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote.

The **Abstract** should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The Abstract should be100 to 200 words in length.. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 **key words** that will provide indexing references to should be listed.

A list of non-standard **Abbreviations** should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined. Use the same abbreviations as the *Journal of Biological Chemistry*.

The **Introduction** should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The **Discussion** should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The **Acknowledgments** of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page,

numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or Powerpoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

References: In the text, a reference identified by means of an author‘s name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author‘s name should be mentioned, followed by ’et al‘. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like ’a‘ and ’b‘ after the date to distinguish the works.

Examples:
Smith (2000), Steddy et al. (2003), (Kelebeni, 1983), (Bill and Claire, 1992), (Chege, 1998; Bauer, 1987a,b; Cohen, 1993,1995), (Kumasi et al., 2001)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., A. Kingori, University of Nairobi, Kenya, personal communication). Journal names are abbreviated according to Chemical Abstracts. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

Examples:

Charnley AK (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer CJ, Prior C (eds) Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin. Oxford: CAB International, pp 181-190.

Msadek T, Kunst F , Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R (1990). Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in Bacillus subtilis : expression of the regulatory genes and analysis of mutations in degS and degU. J. Bacteriol. 172 : 824-834.

Mundree SG, Farrant JM (2000). Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscasa* Baker. In Cherry et al. (eds) Plant tolerance to abiotic stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 201-222.

Peschke U, Beuk V, Bujard H, Gentz R, Le Grice S (1985). Efficient utilization of Escherichia coli transcriptional signals in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 186 : 175-182.

Smith B (2002). Interactions between Ipomea Spp (Del.) Benth. and fluorescent rhizosphere bacteria Of Zea mays, L. and *Sorghum bicolor* L. Moench for *Striga* suicidal germination In *Vigna unguiculata* . PhD dissertation, University of Fort Hare, South Africa.

Short Communications

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. The items of manuscript

preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (1) Abstracts are limited to 100 words; (2) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (3) Results and Discussion should be combined into a single section.

Proofs and Reprints: Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. Because AJMR will be published freely online to attract a wide audience), authors will have free electronic access to the full text (in both HTML and PDF) of the article. Authors can freely download the PDF file from which they can print unlimited copies of their articles.

Copyright: Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

Fees and Charges: Authors are required to pay a $550 handling fee. Publication of an article in the African Journal of Microbiology Research is not contingent upon the author's ability to pay the charges. Neither is acceptance to pay the handling fee a guarantee that the paper will be accepted for publication. Authors may still request (in advance) that the editorial office waive some of the handling fee under special circumstances.

Advertise on AJMR | Terms of Use | Privacy Policy | Help

© Academic Journals 2002 - 2012

Anexo 2 – Normas de publicação da revista Food Chemistry

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Oct 2012 www.elsevier.com/locate/foodchem 1

FOOD CHEMISTRY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

ISSN: 0308-8146

DESCRIPTION

Food Chemistry publishes original research papers dealing with the chemistry and biochemistry of foods and raw materials covering the entire food chain from `farm to fork.'

Topics include:

– Chemistry relating to major and minor components of food, their nutritional, physiological, sensory, flavour and microbiological aspects;

– Bioactive constituents of foods, including antioxidants, phytochemicals, and botanicals. Data must accompany sufficient discussion to demonstrate their relevance to food and/or food chemistry;

– Chemical and biochemical composition and structure changes in molecules induced by processing, distribution and domestic conditions;

– Effects of processing on the composition, quality and safety of foods, other bio-based materials, by-products, and processing wastes;

–Chemistry of food additives, contaminants, and other agro-chemicals, together with their metabolism, toxicology and food fate.

Analytical Section

Analytical papers related to the microbiological, sensory, nutritional, physiological, authenticity and origin aspects of food. Papers should be primarily concerned with new or novel methods (especially instrumental or rapid) provided adequate validation is described including sufficient data from real samples to demonstrate robustness. Papers dealing with significant improvements to existing methods, or data from application of existing methods to new foods, or commodities produced in unreported geographical areas, will also be considered.

– Methods for the determination of both major and minor components of food especially nutrientes and non-nutrient bioactive compounds (with putative health benefits) will be considered.

– Results of method inter-comparison studies and development of food reference materials for use in the assay of food components;

– Methods concerned with the chemical forms in food, nutrient bioavailability and nutritional status;

– General authentication and origin [e.g. Country of Origin Labelling (COOL), Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI), Certificate of Specific Character (CSC)] determination of foods (both geographical and production including commodity substitution, and verification of organic, biological and ecological labelling) providing sufficient data from authentic samples should be included to ensure that interpretations are meaningful.

AUDIENCE

Food technologists, scientists and chemists

IMPACT FACTOR

2011: 3.655 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
CAB Abstracts
Chemical Abstracts
Chemical Engineering Biotechnology Abstracts
Current Contents
EMBASE
EMBiology
Food Science and Technology Abstracts
Global Health
Nutrition Abstracts
Publications in Food Microbiology
SCISEARCH
Science Citation Index
Scopus
Sociedad Iberoamericana de Informacion Cientifica (SIIC) Data Bases

EDITORIAL BOARD

Managing Editor

G.G. Birch, Food and Nutritional Sciences, University of Reading, PO Box 217 Whiteknights, Reading, RG6 6AH, UK, **Email:** j.barnes@reading.ac.uk

Associate Managing Editor

M. Lindley, Lindley Consulting, Crowthorne, England, UK

Editor: Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section

P. Finglas, Inst. of Food Research, Nutrition Health & Con, Norwich Laboratory, Colney Lane, Colney, Norwich, NR4 7UA, UK

Editors

S. Elmore, University of Reading, Reading, England, UK
F. Shahidi, Memorial University of Newfoundland, St John's, Canada
J. Van Camp, Universiteit Gent, Gent, Belgium
R. Wrolstad, Oregon State University, Corvallis, OR, USA

Associate Editors

D. Charalampopoulos, University of Reading, Reading, UK
S.B. Astley, EuroFIR AISBL, Brussels, Belgium

Editorial Board Members

C. Alasalvar, Tubitak Marmara Research Center, Gebze/Kocaeli, Turkey
A. Andrews, University of Wales, Penylan, Cardiff, UK
Y. Bao, University of East Anglia, Norwich, UK
R.G. Berger, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany
T. Beta, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada
Y.F. Chu, Kraft Foods, Glenview, IL, USA
P. Dey, Royal Holloway, University of London, Egham, UK
A. Halmos, RMIT, Melbourne, Australia
A. Ismail, University Putra Malaysia, Upm Serdang, Malaysia
M. Jenner, Bideford, UK
M. Jung, Woosuk University, Jeonbuk, South Korea
S. Kelly, University of East Anglia, Norwich, England, UK
J.F. Kennedy, Chembiotech Laboratories, Worcester, UK
P. Kilmartin, University of Auckland, Auckland Mail Centre, Auckland, New Zealand
J. Lakkis, Pfizer Global Research and Development, Morris Plains, NJ, USA
C.K. Lee, Gelugor, Penange, Malaysia
G. Lisinska, Wageningen University, Wroclaw, Poland
M. Mathlouthi, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims Cedex, France
B. Ou, Brunswick Laboratories, Massachusetts, MA, USA
R. Pegg, University of Georgia, Athens, GA, USA
V. Piironen, University of Helsinki, Helsinki, Finland
S. Polesello, National Research Council of Italy (CNR), Brugherio, Italy
S. Porretta, Stazione Sperimentale per L'Industria delle Conserve Alimentari, Parma, Italy
P. Puwastien, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand
E. Risvik, Matforsk, As, Norway

B. Saad, Universiti Sains Malaysia, Nibong Tebal, Penang, Malaysia
H. Schönfeldt, University of Pretoria, Pretoria, South Africa
K. Thurlow, LGC Limited, Teddington, UK
F. Toldrá, Inst. de Tecnologia del Alimentos, Valencia, Spain
R. Tsao, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, ON, Canada
A. Tudos, Shell Global Solutions, Amsterdam, Netherlands
F. Ulberth, European Commission, Geel, Belgium
C.M. Witthoft,
V. Yaylayan, McGill University, Ste Anne de Bellevue, QC, Canada
L. Yu, University of Maryland, College Park, MD, USA
J. Zhengyu, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu Province, China
R. Zeleny, European Commission, Geel, Belgium
J.H. Banoub, Fisheries and Oceans Canada, St. John's, NL, Canada

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1.Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2.Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3.Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4.Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5.Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6.Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7.Book reviews

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see http://www.elsevier.com/publishingethics and http://www.elsevier.com/ethicalguidelines. The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html ; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also http://www.elsevier.com/conflictsofinterest.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see http://www.elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the

written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck http://www.elsevier.com/editors/plagdetect.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see http://www.elsevier.com/copyright). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult http://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult http://www.elsevier.com/permissions.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: http://www.elsevier.com/authorsrights.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see http://www.elsevier.com/funding.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/fundingbodies.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of $3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet

these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at http://www.elsevier.com/fundingbodies. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: http://www.elsevier.com/authorsrights .

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may requiremediting to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop http://webshop.elsevier.com/languageediting/ or visit our customer support site http://support.elsevier.com for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is
1) on a topic outside the scope of the Journal;
2) lacking technical merit;
3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
5) is poorly written.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of White paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the

paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

• ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Oct 2012 www.elsevier.com/locate/foodchem 7

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See http://www.elsevier.com/highlights for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See http://www.elsevier.com/databaselinking for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

• Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
• Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Provide captions to illustrations separately.
• Produce images near to the desired size of the printed version.
• Submit each figure as a separate file.
A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
http://www.elsevier.com/artworkinstructions
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats
Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.
If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.
Please do not:
• Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.
Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.
Color artwork
Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see http://www.elsevier.com/artworkinstructions.
Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.
Figure captions
Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the
journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (Camellia sinensis) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequente citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, Publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067 or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications, 163*, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style.* (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the jornal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at http://support.elsevier.com.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059 When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from http://get.adobe.com/reader. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com//myarticleservices/offprints). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (http://webshop.elsevier.com//myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at http://www.elsevier.com/trackarticle. You can also check our Author FAQs at http://www.elsevier.com/authorFAQ and/or contact Customer Support via http://support.elsevier.com.

© Copyright 2012 Elsevier | http://www.elsevier.com