



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

JOÃO PAULO DA SILVA RAMOS

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
PIMENTAS MURUPIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E TÓXICAS**

**Prof. Dr^a AUREA ECHEVARRIA
Orientadora**

SEROPÉDICA, RJ

JUNHO – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA FLORESTAL

JOÃO PAULO DA SILVA RAMOS

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
PIMENTAS MURUPIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E TÓXICAS**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr^a AUREA ECHEVARRIA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
JUNHO – 2017

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE
PIMENTAS MURUPIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E TÓXICAS**

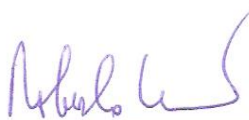
JOÃO PAULO DA SILVA RAMOS

Monografia aprovada em 28 de junho de 2017.

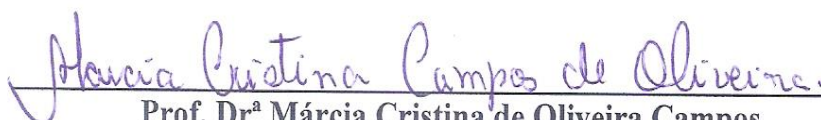
Banca examinadora:



Prof. Drª Aurea Echevarria Aznar Neves de Lima
UFRRJ – ICE – DEQUIM
Orientadora



Prof. Drº Roberto Carlos Costa Lelis
UFRRJ – IF– DPF
Membro



Prof. Drª Márcia Cristina de Oliveira Campos
UFRRJ – ICE – DEQUIM
Membro

**“Todos os seres são iguais pela sua origem,
seus direitos naturais e divinos e seu objetivo final”**

São Francisco de Assis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que ousaram desvendar os mistérios e enigmas em relação às plantas e seus usos.

AGRADECIMENTOS

À Deus essência de tudo, motivador, encorajador e entusiasta.

Aos meus pais, pela incansável oferta de amor aos quais agradeço por me concederem o dom da vida e a construção da nossa relação, pautada na amizade, no respeito e exemplo.

A Rural pela pluralidade, solidariedade, por me ensinar a esperar, crescer, adquirir maturidade, com o mais produtivo e não simplesmente de acordo com vontade imediata. Pelos diversos encontros, imersão em Seropédica, pela síntese que se constitui ser ruralino, e conseqüentemente um ser humano melhor.

A certeza de que existem pessoas boas e que a vida é cheia de encontros, como a professora Andressa Esteves que me apresentou a sua orientadora, á qual me inspira, pela energia, foco, trabalho e constante inovação, além da sua deliciosa amizade e companhia, ser orientado também pela professora Aurea nesses anos fez destacar também a importância da colaboração e pluralidade na pesquisa, procurando sanar mazelas da nossa sociedade e manter a integridade do meio ambiente. Aos amigos companheiros de bancada do laboratório NUSQUIMED, agradeço pela convivência, pelas incansáveis horas juntos, pela proatividade, pelos ensinamentos, acolhida, diversão e fraternidade.

Aos grupos organizados da Rural que tive a oportunidade de fazer parte. Como, o Grupo de Oração Universitário (GOU); a Flora Jr – Empresa Júnior de Engenharia Florestal, que muito além das noções de empreendedorismo e trabalho em equipe, possibilitou adquirir competência, coragem e visão para resolver problemas; meu ingresso na equipe do Projeto Rondon sob orientação do professor Breno Cruz, na Operação Itacaiunas, no município de Rio Maria/ PA, possibilitando a equipe exercer na prática os conhecimentos obtidos na graduação, bem como desenvolver atividades lúdicas, mas com a excelência técnica adquiridas na Rural, além de trabalhar em uma equipe multidisciplinar e ter adquirido mais uma família...a amarela do Rondon.

Aos que me inspiram, dão força e recebem o nome de amigos agradeço pela paciência, pelo zelo: Talita Pi Sung, Teresa Cobra, Luciene Reciere, Amanda Arantes, Luiza Lapenne, Rodrigo Costa, Fernanda Silva, Antônio Ambrósio, Luiza Santos, Núbia Nunes, Carol Souza da Cruz, Gisele Nunes, Gabriela Rodrigues, Priscilla Motta, Danielle Freitas, Isabel Spina, Cleriston Andrade, Letícia Westin, Tairyne Pizollato, Thamires Guterres, Richard Pires, Alessandra Devitte, aos Abbade, a Congregação das Irmãs Franciscanas do Amparo, aos professores que contribuem de modo incansável pela formação, inclusive extra classe: Alexandre Ravelli, Eliane Jacques, Emanuel Araújo, Gilmara Palermo, Helena Lima, Helena Montano, Leila Quintaneiro, Michele Duarte de Menezes, Silvia Martin, Marcelo Duncan, Marcos Gervásio, Natália Dias, Rogério Silva, Tatiana Cotta, Tiago Böer, pelo sorriso da Dona Zilah pelo IF e por minha afilhada Mariana pelo excesso de fofura.

Por fim, gratidão a todos pelo caminhar, a banca pelas contribuições, acessibilidade, disponibilidade e por todos aqueles que de algum modo contribuíram com este trabalho!

RESUMO

As pimentas, de maneira geral, pertencem à família Solanaceae, com ampla distribuição, concentrada na região neotropical. Composta por diversos gêneros e, são ricas em metabólitos das classes dos alcalóides e flavonoides entre outros. O gênero *Capsicum* possui propriedades antioxidantes que atuam na prevenção de doenças como as cardíacas, diabetes, câncer e até no envelhecimento precoce. As pimentas Murupis, pertencem ao gênero *Capsicum* e, são endêmicas e tradicionalmente cultivadas na região amazônica, comumente empregadas na dieta da população local. Contudo, em função de sua ampla utilização é necessário conhecer a presença das classes de constituintes secundários, devido a importância das substâncias biotivas provenientes das espécies vegetais. Dentre as classes de metabolismo especial, amplamente distribuídas no reino vegetal, os compostos fenólicos são substâncias químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que conferem o poder antioxidante atuando frente às espécies reativas de oxigênio, entre outras. Neste trabalho foram obtidos os extratos hidroalcoólicos de duas variedades de pimentas Murupis (pimenta I e pimenta II), *C. chinense*, e realizada a prospecção fitoquímica sendo observadas as classes dos flavonoides, isoflavonas e fenóis como mais abundantes. Foram avaliadas os teores de fenóis totais e flavonoides totais indicando uma presença mais expressiva na pimenta I. A atividade antioxidante foi avaliada frente ao radical DPPH com resultados que correlacionaram a presença de fenóis e flavonoides. Finalmente, foi investigada a toxidez geral dos extratos hidroalcoólicos das pimentas Murupis utilizando-se o ensaio da letalidade da *Artemia salina*. Os resultados obtidos para os valores de DL₅₀ foram 240 ppm e 240 ppm para as pimentas I e II, respectivamente. Assim, o conjunto dos resultados obtidos neste trabalho contribuíram com o conhecimento dessa espécie, corroborando para seu emprego da espécie na dieta, assim como a preservação, conservação e proteção da mesma.

Palavras-chave: pimentas Murupis, Solanaceae, *Capsicum chinense*, compostos fenólicos, flavonóides, DPPH, *Artemia salina* Leach.

ABSTRACT

The peppers, in general, belong to the family Solanaceae, with wide distribution, concentrated in the neotropical region. Composed of several genera and are rich in metabolites of the classes of alkaloids and flavonoids among others. The genus *Capsicum* has antioxidant properties that act to prevent diseases such as heart disease, diabetes, cancer and even premature aging. The Murupis peppers belong to the genus *Capsicum* and are endemic and traditionally cultivated in the Amazon region, commonly used in the diet of the local population. However, due to its wide use it is necessary to know the presence of classes of secondary constituents, due to the importance of bioactive substances from plant species. Among the classes of special metabolism, widely distributed in the plant kingdom, phenolic compounds are chemical substances that present hydroxyl and aromatic rings, in simple forms or polymers, that confer the antioxidant power acting against the reactive oxygen species, among others. In this work the hirdroalcoholic extracts of two varieties of Murupis peppers (pepper I and pepper II), *C. chinense*, were obtained, and the phytochemical prospection was carried out, being observed the classes of flavonoids, isoflavones and phenols as more abundant. The total phenols and total flavonoids contents were evaluated indicating a more expressive presence in pepper I. The antioxidant activity was evaluated against the radical DPPH with results that correlated the presence of phenols and flavonoids. Finally, the general toxicity of hydrous extracts of Murupis peppers was investigated using the *Artemia salina* lethality assay. The results obtained for LD50 values were 240 ppm and 240 ppm for peppers I and II, respectively. Thus, all the results obtained in this work contributed to the knowledge of this species, corroborating for its use of the species in the diet, as well as preservation, conservation and protection of the same.

Key words: Murupis peppers, Solanaceae, *Capsicum chinense*, phenolic compounds, flavonoids, DPPH, *Artemia saline* Leach.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Plantas Medicinais	2
2.1.1 Aspectos culturais e sociais	2
2.1.2 Política de Produtos Naturais	4
2.1.3 Metabolismo das Plantas	5
2.1.3.1 Metabolismo Primário	6
2.1.3.2. Metabolismo Especial	7
2.2. Atividade Biológica de Produtos de Origem Vegetal	8
2.3 Descrição do Gênero <i>Capsicum</i>	9
2.3.1 Área de Ocorrência do gênero <i>Capsicum</i>	9
2.3.2 Importância Econômica	10
2.3.3 Valor Nutricional das Pimentas	11
2.3.4 Aspectos Morfológicos do Gênero <i>Capsicum</i>	11
2.4 Atividade Antioxidante	13
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1. Objetivos Específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Condução do experimento e obtenção do material vegetal	15
4.2. Obtenção das Pimentas, extratos hidro-alcoólicos e extratos secos	15
4.3. Prospecção Fitoquímica	16
4.4. Determinação do Teor de Fenóis Totais	18
4.4.1. Ensaio dos fenóis totais	18
4.4.3. Preparo da curva analítica com ácido gálico	18
4.5. Determinação do Teor de Flavonóides	19
4.5.1 Preparo da curva analítica com quercetina	19
4.6 Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH	19
4.7. Avaliação de toxidez frente a <i>Artemia salina</i> Leach	21
4.7.1 Procedimento para o Ensaio de Toxidez	22
4.7.2 Cálculos	23

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Obtenção dos Extratos	23
5.2 Principais Classes dos Metabólitos Especiais	23
5.3 Avaliação do Teor de Fenóis e Flavonóides.....	25
5.3.1 Fenóis totais	25
5.3.2 Flavonóides totais	28
5.4 Ensaio de Atividade Antioxidante.....	30
5.5 Ensaio Toxidez Geral	31
5.5.1 <i>Artêmia salina</i> Leach.....	31
5.6 Considerações Finais	31
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

SHU - Unidades de Calor Scoville

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DL₅₀ – Dose Letal, capaz de levar a 50% da letalidade dos indivíduos

CE₅₀ – Concentração Efetiva, capaz de Inibir 50% de determinado evento

AA% - Porcentagem de Atividade Antioxidante

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Origem do metabolismo primário e secundário.....	6
Figura 2 - Mapa das zonas de expansão pré-cambriana para quatro espécies domesticadas com <i>Capsicum</i>	9
Figura 3 - Cálice com apresentação de constrição anelar (direita), característica específica do gênero <i>Capsicum chinense</i>	12
Figura 4 - Mecanismo de ação antioxidante neutralizadora de radical livre.....	14
Figura 5 - Pesagem do material vegetal ^(a) e preparação do extrato hidro alcoólico ^(b)	15
Figura 6 - Fluxograma de obtenção de extratos brutos e secos.....	16
Figura 7 - Fluxograma para identificar classes de metabólitos especiais.....	16
Figura 8 - Fluxograma para realização do ensaio de fenóis totais.....	18
Figura 9 - Fluxograma para realização do ensaio de flavonoides.....	19
Figura 10 - Concentrações para realização do ensaio do DPPH.....	20
Figura 11 - Fluxograma para realização do ensaio do DPPH.....	21
Figura 12 - Fluxograma para obtenção dos microcrustáceos.....	22
Figura 13 - Metodologia para emprego de ensaio para avaliar a bioatividade dos extratos frente a <i>Artemia salina</i> Leach.....	22
Figura 14 - Curva de calibração de Ácido Gálico (triplicata).....	26
Figura 15 - Reação do reagente Folin-Denis frente aos extratos de Pimenta I ^(A) e II ^(B) e a solução saturada de carbonato de sódio.....	27
Figura 16 - Curva de calibração de Quecertina (triplicata).....	29
Figura 17 - Percentual de Atividade Antioxidante frente aos extratos de Pimenta I (A) e II (B).....	30
Figura 18 - Curva analítica do log da dose frente o princípio da letalidade da <i>Artemia salina</i> Leach.....	31
Figura 19 - Cistos de náuplios de <i>Artemia salina</i> Leach.....	32
Figura 20 - Diferentes concentrações de extratos expostas à luz e ação da <i>Artemia salina</i> Leach.....	32
Figura 21 - Curva analítica do log da dose frente o princípio da letalidade da <i>Artemia salina</i> Leach.....	33

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Metodologia para triagem Fitoquímica	17
Tabela 2 - Classes de metabólitos especiais presentes em duas espécies de Pimenta da Amazônia (Murupi) extraídas em extratos etanol + água (9:1, v/v).....	24
Tabela 3 - Valores obtidos nas diferentes concentrações da solução do padrão de ácido gálico (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis.....	25
Tabela 4 - Valores das absorvâncias dos extratos de pimentas frente à solução do padrão de carbonato de sódio (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis	26
Tabela 5 - Valores obtidos nas diferentes concentrações da solução do padrão de quecertina (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis.....	28
Tabela 6 - Valores de concentração, volume e número de larvas vivas e mortas nos ensaios de toxicidade geral frente a <i>Artemia salina</i> Leach para o extrato hidro alcoólico de pimenta I.....	32
Tabela 7 - Valores de concentração, volume e número de larvas vivas e mortas nos ensaios de toxicidade geral frente a <i>Artemia salina</i> Leach para o extrato hidro alcoólico de pimenta II.....	33
Tabela 8 - Valores obtidos dos extratos de pimentas frente aos ensaios de determinação de Fenóis, Flavonoídes e Atividade Antioxidante.....	34

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais vêm sendo amplamente pesquisadas por apresentarem em seu processo metabólico especial compostos orgânicos bioativos de diversas classes. As pimentas são muito utilizadas na culinária em todo o mundo, pertencem à diversos gêneros e, ricas em metabólitos das classes dos alcaloides e flavonoides entre outros. As pimentas como a vermelha, dedo-de-moça e malagueta pertencem ao gênero *Capsicum* da família Solanaceae e possuem propriedades antioxidantes que atuam na prevenção de doenças como as cardíacas, diabetes, câncer e até no envelhecimento precoce. (BARBOSA *et al.*, 2002). As pimentas tradicionalmente cultivadas na região amazônica (Amazonas e Pará) são chamadas de pimentas Murupi e, tradicionalmente, são consumidas em conserva ou no tucupi e, são da espécie *Capsicum chinense* sendo reconhecidas pelo sabor especial e picante.

Os radicais livres e outros oxidantes, vêm sendo considerados nos últimos anos como grandes causadores de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes *mellitus* tipo I (SOUSA *et al.*, 2007). Atualmente, o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais a saúde humana (ALVES *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2008). Contudo, tem-se estudado pouco os mecanismos relacionados à produção qualitativa e quantitativa desses produtos naturais, principalmente, sobre os aspectos ecológicos e os processos bioquímicos, que conduzem a planta à produção desses metabólitos especiais.

Mas, ao contrário de outros organismos, as plantas possuem uma quantidade significativa de carbono absorvido e energia para a síntese de uma grande variedade de moléculas orgânicas que parecem ter um papel direto na atividade fotossintética, respiratória, processos de assimilação de nutrientes, transporte de solutos ou a síntese de proteínas, hidratos de carbono ou lípidos. Os metabólitos secundários ao contrário dos metabólitos primários, não apresentam uma função definida nos processos acima mencionados e, ainda, nem todos são encontrados em todos os grupos de plantas. Eles são sintetizados em pequenas quantidades e, muitas vezes a sua produção é limitada a um certo gênero de planta, uma família, ou mesmo algumas espécies.

Contudo, a etnobotânica possibilita a compreensão da estrutura lógica da relação entre homens e a flora que os cercam. Por elucidar a concepção humana sobre as plantas e suas relações, é uma importante forma de conservação da integridade de produtos florestais madeireiros e não madeireiros, bem como do conhecimento das comunidades tradicionais. O Brasil é considerado um dos sete países com os maiores índices de biodiversidade, sendo o primeiro do *ranking* quanto ao número de plantas superiores, além de ser um país com diversas etnias indígenas e culturas tradicionais que englobam: populações de quilombolas, afro-brasileiros, caiçaras, ribeirinhos, jangadeiros, dentre outras.

Assim, neste trabalho, objetivou-se a realização da prospecção fitoquímica em extratos hidro-alcoólicos de pimentas Murupi, do gênero *Capsicum* afim de avaliar as classes presentes e detectar o potencial antioxidante dessas substâncias, bem como o emprego de bioensaios que avaliam a toxidez desses extratos, possibilitando contribuir com o conhecimento dessa espécie, e assim, com sua conservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

2.1.1 Aspectos culturais e sociais

A relação entre o homem e as plantas é milenar. Por meio do conhecimento das características e utilidades das plantas o homem primitivo, aos poucos, conseguiu fixar moradia e abandonar os hábitos nômades. As plantas tornaram-se o alimento principal na dieta humana e passaram a ter diferentes finalidades. O conhecimento popular adquirido durante centenas de anos, e transmitido às gerações futuras, tem beneficiado o homem, possibilitando a descoberta de novos medicamentos utilizados atualmente no tratamento de diversas enfermidades. (OLGUIN *et al.*, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento utiliza plantas na atenção primária à saúde. No Brasil, acredita-se que 90% da população já utilizou alguma planta medicinal. A rica biodiversidade brasileira e as heranças culturais de índios, negros e europeus contribuem para que as plantas sejam consideradas uma área estratégica para o desenvolvimento do país (BOAS; GADELHA, 2007; JOHARCHI; AMIRI, 2012). Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS Jr. *et al.*, 2006).

Contudo, as plantas medicinais fazem parte do patrimônio cultural de cada país e envolvem práticas que são transmitidas de geração a geração, há centenas de anos, muito antes do desenvolvimento da medicina atual. Esses fatos corroboram para indicar as plantas de suma importância, não apenas como fonte de alimento, mas como medicamento para o homem. Neste sentido, o uso da fitoterapia faz parte da cultura de diversos grupos da população, sendo utilizada e difundida por muitas gerações. Entretanto os progressos tecnológicos da medicina alopata e da indústria farmacêutica, a partir do final do século XX, desestimularam o uso das plantas medicinais, sob a alegação da falta de dados científicos que assegurassem seus efeitos (CALIXTO, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2006).

Neste mesmo viés, o mercado farmacêutico nacional e internacional em contrapartida tem valorizado e ampliado a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos oriundos de plantas. Esta motivação ocorre pelo fato da produção de medicamentos a base de vegetais apresentarem uma melhor relação custo/benefício quando comparada aos produtos sintéticos, sua ação biológica apresentar baixa toxicidade e efeitos colaterais, custo de produção e preço de venda mais acessíveis, ademais de outros aspectos. Ainda cabe destacar a busca por hábitos mais saudáveis de vida e a valorização do meio ambiente pela sociedade através do consumo de produtos naturais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; ANDRIÃO *et al.*, 2010; SOUZA-MOREIRA, SALGADO; PIETRO, 2010; ETHUR *et al.*, 2011; OLIVEIRA, GILBERT ; BÔAS, 2013; CORRÊA JR, 2014).

O uso de substâncias derivadas de plantas tem notório destaque, tanto como agentes terapêuticos, quanto como matéria-prima para síntese de medicamentos. A importância das plantas medicinais pode ser observada no fato de que das 252 fármacos consideradas básicos e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas (BRASIL, 2006). Estima-se que 25% dos medicamentos atualmente disponíveis têm origem, direta ou indiretamente, a partir das plantas medicinais ou seu conhecimento tradicional associado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

A deficiência de informações para o manejo adequado, a falta de tradição de cultivo, a qualidade acerca da cadeia de produtiva de plantas medicinais no Brasil pode se explicar do desinteresse dos grandes laboratórios farmacêuticos, da comunidade científica ou dos órgãos governamentais de pesquisa e desenvolvimento sobre o tema. Portanto, a inserção do estudo do tema no contexto científico favorece seu desenvolvimento, estabelecimento, progresso e disseminação. Deste modo, sua eficácia e segurança de uso são comprovadas cientificamente, diminuindo o descrédito, alavancando seu crescimento, estimulando mais pesquisas e inovações; e principalmente, banindo o preconceito ainda flagrante entre profissionais de saúde, gestores e usuários (FIGUEREDO *et al.*, 2014).

São nestes ambientes que muitos pesquisadores buscam informações sobre as plantas e suas propriedades químicas, que podem servir como matéria-prima para a síntese de novos compostos bioativos (ELISABETSKY *et al.* 2001). Geralmente, esses ambientes tropicais ou subtropicais, possuem biodiversidade alta (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2001) e lá estão estabelecidas algumas comunidades primitivas ou seus descendentes diretos, que herdaram conhecimentos sobre as propriedades curativas das plantas, como: as benzedadeiras, as parteiras, os ervateiros e os pajés (DI STASI, 1996; ELISABETSKY, 2001; AMOROZO, 1996; AMOROZO, 2002).

Contudo, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Atualmente, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.

Os mercados tradicionais são importantes por reunir, concentrar, manter e difundir o saber empírico sobre a diversidade de recursos tanto da fauna como da flora, sendo fontes imprescindíveis para a resiliência e manutenção do conhecimento acerca das espécies medicinais (MONTEIRO *et al.*, 2010). A fitoterapia, método de tratamento caracterizado pela utilização de medicamentos obtidos de plantas medicinais em suas diversas preparações (BRASIL, 2013b), foi um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, além de ser por muito tempo a única terapia disponível ao ser humano. Em algumas ocasiões, as plantas curavam; em outras, matavam ou produziam graves efeitos colaterais (MELO *et al.*, 2009).

Na região Amazônica foram catalogadas em duas comunidades que vivem nas margens da Baía de Marajó-PA, 260 plantas entre nativas e cultivadas; 1200 são comercializadas no mercado Ver-o-peso em Belém-PA; outras 242 espécies são cultivadas em quintais residenciais, em Belém (AMOROZO; GELY 1988). Esta biodiversidade do país contribuiu para que o uso das plantas medicinais fosse considerado um campo estratégico para o Brasil, cujo maior potencial econômico da biodiversidade está na descoberta de novas moléculas derivadas diretamente ou sintetizadas a partir de recursos biológicos (BRITO, 2010).

O termo etnobotânica foi empregado pela primeira vez em 1895 por Harshberger, que embora não o tenha definido, apontou maneiras pelas quais poderia ser útil à investigação científica da relação existente entre as plantas medicinais, os hábitos alimentares de populações tradicionais. Desde então, foram empregadas inúmeras definições para etnobotânica. Dentre elas destacam-se a seguinte proposta.

Ciência que estuda a relação entre humanos e plantas em toda sua complexidade, e é baseada geralmente na observação detalhada e estudo do uso que uma sociedade faz das plantas, incluindo as crenças e práticas culturais associadas com este uso. Foca não somente as plantas medicinais,

mas também outros produtos derivados da natureza, como: alimentos, plantas utilizadas em rituais, corantes, fibras, venenos, fertilizantes, materiais de construção para casas, barcos, ornamentos, óleos, etc. (HEINRICH *et al.*, 2004).

A etnobotânica aplicada ao estudo de plantas medicinais trabalha em estreita cumplicidade com a etnofarmacologia, que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados por determinado agrupamento humano. Um dos pioneiros em estudos etnobotânicos, Richard Evans Schultes, dedicado à pesquisa da flora da América tropical, relata inúmeras espécies vegetais brasileiras usadas por caboclos e indígenas da Amazônia (SHULTES, 1963).

A etnobotânica é citada na literatura como sendo um dos caminhos alternativos que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos. (MACIEL *et al.*, 2012). Portanto, subsidiar-se dos conhecimentos associados com esta ciência é fundamental para investigação de classes de metabólitos especiais em vegetais, mas este processo deve ter como premissa atenção a região, época e estágio de desenvolvimento preferidos para coleta, envolve também, procedimentos especiais como preparação de exsiccatas. O depósito de exsiccata em herbário credenciado é muito útil para evitar enganos com a espécie que está sendo estudada, pois é o modo de assegurar a correta identificação dos elementos botânicos.

2.1.2 Política de Produtos Naturais

O Brasil tem uma rica história de uso das plantas medicinais no tratamento dos problemas de saúde da população, uso este construído com base na experiência e transmitido de forma oral (BRUNING *et al.*, 2012). Largamente usada até meados do século XX, a Fitoterapia entrou em declínio com a intensificação do uso dos medicamentos industrializados (BRUNING *et al.*, 2012). Com o crescente desenvolvimento da química, novas substâncias foram isoladas em laboratório e delas novos produtos de síntese surgiram, levando à paulatina substituição do uso das plantas pelo uso dos medicamentos sintetizados em laboratório, o que ocorreu de forma intensa na segunda metade do século XX (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001), quando se consolidou a indústria farmacêutica.

Além disso, no século XX, houve, em diversos países, intenso trabalho de desqualificação do saber popular sobre as plantas medicinais (FIGUEREDO, 2011; CARLINI, 1983), como a proibição da sua indicação por pessoas leigas e até mesmo por médicos (CHEVALLIER, 1996). Esta ofensiva contra a Fitoterapia não se fundamentou apenas na suposta inferioridade da eficácia e da segurança da planta medicinal em comparação com o medicamento sintético, nem da imprecisão e da objetividade limitada do saber popular em comparação com o saber científico (LAKATOS; MARCONI, 2001).

Interesses mercantilistas, cada vez mais presentes no setor saúde, tiveram importante papel na desvalorização do uso da Fitoterapia (FIGUEREDO, 2011). A partir da explicitação desse contexto histórico, podemos melhor situar a formulação e a implementação da política de plantas medicinais e de fitoterápicos. Esta política representa o reconhecimento do avanço na comprovação científica da eficácia e da segurança das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos, o saber popular neste campo, e também constata que o uso da terapêutica centrada no uso de medicamentos sintéticos não cumpriu a promessa implícita e explícita de dar conta do tratamento das doenças, pelos altos custos, pelos significativos efeitos adversos que têm

os medicamentos sintéticos, pelos resultados nem sempre satisfatórios, o que tem levado grande número de pessoas a buscar formas alternativas de tratamento menos agressivas (BRUNING *et al.*, 2012).

O consumo indiscriminado de qualquer recurso natural, por uma população que atualmente é de cerca de seis bilhões de pessoas, fatalmente vai gerar escassez. No Brasil existem entre 60 e 250 mil espécies vegetais, supõe-se que pelo menos 40% contêm propriedades farmacêuticas, sendo que a maioria ainda não foi estudada (BRITO, 1993; BRAZ-FILHO, 1994; GOTTLIEB *et al.*, 1996). A perda de informações preciosas seria irrecuperável.

O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças. (BRAZ-FILHO, 2009).

2.1.3 Metabolismo das Plantas

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007). O metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula na presença de enzimas específicas que possibilitam a biossíntese dos metabólitos primários e dos secundários, hoje denominados especiais, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas.

As rotas metabólicas podem ser inibidas ou ativadas pela presença de estímulos externos ou internos, como a concentração exógena e/ou endógena de determinados nutrientes, que envolvem a ativação de genes relacionados às enzimas que controlam as rotas metabólicas

A complexidade do metabolismo vegetal é o principal obstáculo para que se compreenda realmente como, quando e porque certos compostos químicos são produzidos. O metabolismo vegetal envolve a biossíntese de compostos denominados primários e especiais. Os primários são comuns a todas as plantas e são essenciais na síntese de compostos vitais, bem como na manutenção dos processos biológicos que asseguram vida do indivíduo, os secundários são específicos de um determinado grupo de plantas, e estão relacionados com a capacidade de sobrevivência num dado ambiente (MOYNA; MENÉNDEZ, 2001).

É importante salientar que os metabólitos primários e secundários estão intimamente ligados. Os metabólitos primários, uma vez produzidos, tornam-se substratos para a formação de compostos secundários, estes por sua vez, permitem que a espécie sobreviva no ambiente sobre forte pressão de agentes competitivos e nocivos a sua perpetuação, o que indiretamente permite à planta uma condição homeostática, garantindo melhores condições para a produção de metabólitos primários. Desta maneira, os dois grupos de compostos sintetizados pelas plantas são interdependentes, quando avaliados dentro das condições naturais em que se encontram os vegetais.

Avaliando-se as relações entre as duas vias biossintéticas, numa visão reduzida, fora do contexto natural em que está inserido o vegetal, não se espera uma interferência das rotas secundárias sobre as rotas primárias, e sim o contrário, visto que as vias metabólicas primárias são as fontes de substrato para as vias secundárias. As plantas após converterem a energia luminosa em energia química, podem reduzir o CO₂ formando carboidratos, que serão utilizados como substrato para a formação das

substâncias fundamentais do metabolismo, cujo eixo central envolve a via glicolítica e o ciclo de Krebs (STRYER, 1996).

A partir dessas vias metabólicas todas as outras são supridas, direta ou indiretamente, dando início a biossíntese de compostos, sejam eles do metabolismo primário, para formação de lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos, glicídios, ou secundário, para a formação de alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas e outros (SANTOS, 2001; MOYNA; MENÉNDEZ, 2001).

A composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Infelizmente, mesmo diante do potencial econômico e social que os vegetais apresentam, apenas cerca de 5 a 15% de 250 a 500 mil espécies de plantas tem sido objeto de estudo quanto a sua composição química e atividade biológica dos seus produtos metabólicos (ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2001). Estes dados apontam para a necessidade de se ampliar os estudos nesta área do conhecimento, estendendo a compreensão sobre as vias biossintéticas primárias e secundárias e a relação que existe entre elas. A Figura 1 mostra a origem do metabolismo primário e secundário.

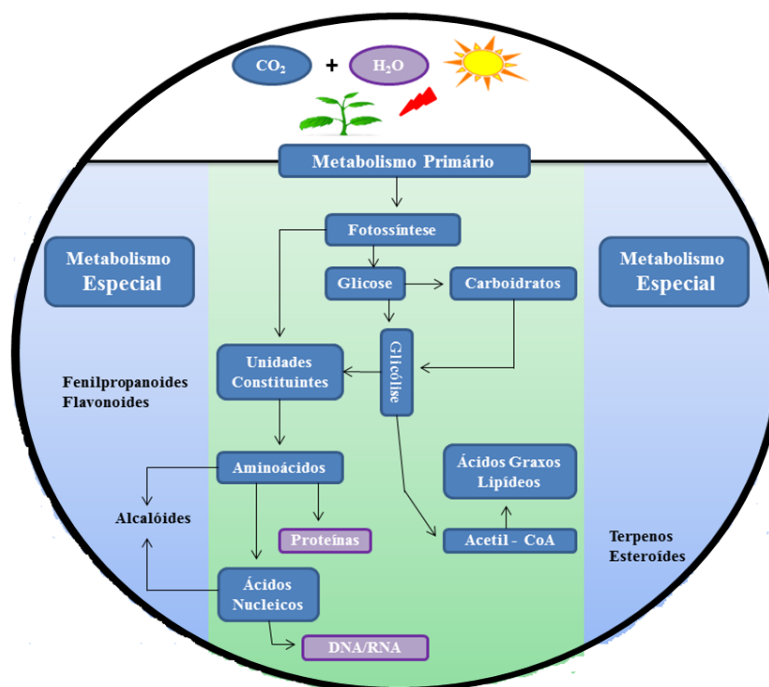


Figura 1 - Origem do metabolismo primário e secundário. Fonte: Adaptado de Universidad Complutense, (2009).

2.1.3.1 Metabolismo Primário

As plantas possuem um metabolismo geral comum a todos os seres vivos, e que por isso, recebe o nome de “metabolismo primário”. Faz parte deste, a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência do indivíduo, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, e seus polímeros derivados. Contudo, para a síntese destes compostos, são necessários nutrientes, água e luz provenientes do meio (MARTINS *et al.*, 1995; DISTASI, 1996).

De acordo com Santos (2001) a teoria evolucionista explica porque o metabolismo básico é muito semelhante entre os vegetais; de acordo com essa teoria, todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características. É por isso que as principais macromoléculas são as mesmas entre os vegetais.

Pode-se dizer que nas células existem quatro tipos de pequenas moléculas orgânicas (açúcares, ácidos graxos, aminoácidos e nucleotídeos), as quais darão origem às principais macromoléculas da célula (carboidratos, lipídeos, proteínas e os ácidos nucleicos), que por sua vez, participam da formação de estruturas complexas responsáveis por funções distintas nas células, como: a parede celular, a membrana plasmática, as enzimas e o DNA (SANTOS, 2001).

Além disso, são nas vias metabólicas primárias, principalmente entre a glicólise e o ciclo de Krebs, que estão presentes os compostos químicos: fosfoenolpiruvato, α -cetogluturato, aspartato e acetil-CoA, que são os precursores das principais vias do metabolismo secundário.

2.1.3.2. Metabolismo Especial

Os metabólitos especiais, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008). O termo designado metabolismo secundário, cria a falsa impressão de que os metabólitos pertencentes a este grupo possuem menor importância, não sendo necessários à sobrevivência da planta. Por isso, em contraposição ao termo usualmente definido, Gottlieb *et al.*, (1996) propõem a utilização do termo metabolismo especial.

Os metabólitos especiais são encontrados principalmente em plantas, fungos e outros microrganismos, mas também estão presentes em animais. Atualmente, estima-se que existam mais de 200.000 metabólitos conhecidos (HARTMANN, 2007). Diante da diversidade existente, toda essa gama de substâncias produzidas são sintetizadas por quatro vias principais: via do acetato-malonato, acetato-mevalonato, via do metileritritol fosfato e a via do ácido chiquímico. Os organismos apresentam regiões gênicas específicas envolvidas em diferentes funções como resposta a estresse, proteção e produção de metabólitos secundários (ROCHA *et al.*, 2005). Em espécies vegetais, conhecer regiões gênicas é de fundamental importância para compreender o mecanismo de produção de compostos específicos com intuito de sintetizar e decodificar a rota metabólica em espécies de interesse econômico.

É através dos metabólitos especiais que a planta responde aos diferentes fatores ambientais, sejam eles físicos ou biológicos, permitindo sua comunicação e interação com diferentes organismos, atraindo ou repelindo, sustentando ou destruindo (MARTINS *et al.*, 1995; MARASCHIN; VEPOORTE, 1999). Além disso, alguns dos fatores discutidos apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo especial, como por ex.: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros. (GOBBO-NETO, L.; e LOPES, N.P *et al.*, 2007).

De acordo com Santos (2001) a produção de metabólitos especiais é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação, sendo cada um desses processos governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade, estágio de desenvolvimento e ambiente. Diferentes compostos químicos podem ser produzidos durante toda a vida do vegetal, em

determinadas épocas e em determinado instante. Eles podem ser uma resposta específica e de curta duração em resposta a um determinado evento, como por exemplo, na relação simbiótica com microorganismos, quando se produzem substâncias fenólicas; ou não específica, como na produção de flavonóides, que por sua vez, possui ação protetora a raios UV, antifúngica, antibacteriana e atrativa a polinizadores, tornando-se necessário durante toda a vida da planta (STOESSL, 1986; SANTOS, 2001; MOYNA; MENÉNDEZ, 2001).

As substâncias provenientes do metabolismo especial são diferenciadas para cada gênero ou espécie de planta, a ponto de se propor um modelo de classificação sistemática vegetal utilizando os metabólitos especiais como um dos parâmetros (DI STASI, 1996; GOTTLIEB *et al.*, 1996; ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2001; SANTOS, 2001).

2.2 Atividade Biológica de Produtos de Origem Vegetal

De acordo com Gottlieb *et al.*, (1996) cada categoria biossintética de metabólitos especiais pode compreender um número fabuloso de derivados. Seguindo esse pensamento, Sandis e Di Blasi (2000) sugerem que as plantas são como uma indústria química que em todo o momento, ou em dada circunstância, estão produzindo novas e complexas substâncias químicas e que geralmente são ativas sobre outros organismos, e por esse motivo, muitas são exploradas por possuírem atividade medicinal.

Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (SIMÕES *et al.*, 2007). Estes autores propõem que a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato.

O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, compostos que tem em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008). Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana.

Os flavonóides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C₁₅) no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C₆-C₃-C₆. Já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo. Esse grande número de compostos surge da ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica. Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, têm-se diferentes classes de flavonóides: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas, com múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral, poder de redução à fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno à agregação plaquetária. Assim, a ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (ARAÚJO, 2008; FILHO *et al.*, 2001).

O excesso desses radicais livres pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena. De acordo com Souza *et al.*

(2007), denominam-se antioxidantes, as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (BARREIROS *et al.*, 2006).

De acordo com o World Cancer Research Fund (2007), uma dieta com uma grande quantidade e variedade de frutas, legumes e verduras pode prevenir 20% ou mais dos casos de câncer. Essa redução no risco de desenvolvimento de enfermidades crônicas não transmissíveis se dá pela combinação de micronutrientes, antioxidantes, substâncias fitoquímicas e fibras presentes nestes alimentos. Os alimentos com propriedades de prevenir e/ou minimizar enfermidades crônicas não transmissíveis recebem a denominação de alimentos funcionais e os princípios ativos, de substâncias bioativas.

2.3 Descrição do Gênero *Capsicum*

2.3.1 Área de Ocorrência do gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae, apresenta cerca de 3000 de espécies. No Brasil encontra-se um número expressivo de espécies (350 espécies) utilizadas sob diferentes formas por uma ampla gama de culturas humanas, também, ao redor do mundo, destacando-se as populações tradicionais e não tradicionais que domesticaram seu manejo. Este gênero pode ser associado, por exemplo, à medicina tradicional humana (CICHEWICZ; THORPE, 1996; MOLINA-TORRES *et al.*, 1999; OTERO *et al.*, 2000), para o tratamento de enfermidades em animais domésticos, bem como nos ritos de passagem que destacam a bravura de jovens guerreiros indígenas (MTAMBO *et al.*, 1999).

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas no mundo, sendo utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (YAMAMOTO; NAWATA 2005; BENTO *et al.*, 2007). Foi relatado por Martinet *al.* (1979), que o centro de origem de *C. annuum* é o México; de *C. frutescens* as Américas tropical e sub-tropical; de *C. baccatum*, a América do Sul; *C. pubescens* foi dispersada a partir dos Andes e *C. chinense*, em toda a América tropical, sendo a espécie mais comum encontrada na Amazônia. Entretanto, pode-se afirmar que a relação do homem com às pimentas teve início há 10 ou 12 mil anos, quando as primeiras populações habitaram as Américas. Das várias espécies selvagens de *Capsicum*, o mapa de expansão pré-colombiana revela quatro das cinco espécies domesticadas de acordo com a Figura 2.

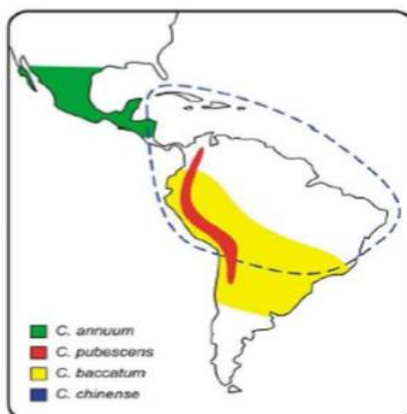


Figura 2 - Mapa das zonas de expansão pré-cambriana para quatro espécies domesticadas com *Capsicum*. Fonte: Nuez *et al.*, (1996).

O centro de origem do gênero *Capsicum* é a América, destacando-se as regiões tropicais (REIFSCHNEIDER, 2000). Com base em informações geográficas e dados de eletroforese, McLeod *et al.* (1982), elaboraram a hipótese de que a “área nuclear” seria numa zona central da Bolívia. Esses autores sugeriram que a espécie ancestral se dividiu em dois agrupamentos, um de flores brancas e outro de flores púrpuras que, subseqüentemente, sofreram especiação quando se formou a cordilheira dos Andes. As plantas foram forçadas a adaptarem-se às novas condições climáticas que resultaram em características distintas como pungência e porte ereto das bagas (SANTOS, 2009). Esta última característica, exclusiva do gênero *Capsicum*, é atribuída a um alcalóide denominado capsaicina, que se acumula na superfície da placenta (tecido localizado na parte interna do fruto). Quando o fruto sofre dano físico essa substância é liberada. A capsaicina pode ser medida em Unidades de Calor Scoville (‘Scoville Heat Units - SHU’) por meio de aparelhos específicos. O valor varia de zero, ou seja, pimentas doces (como a biquinho) a geralmente 300.000 (pimentas muito picantes). Sendo as recordistas brasileiras em pungência: a pimenta Murupi (223 mil) e a Cumari-do-Pará (210 mil), em função da escala.

2.3.2 Importância Econômica

A cadeia produtiva de pimenta destaca-se na comercialização *in natura*, em pequenas quantidades no atacado e varejo, valendo ressaltar que esse mercado é fortemente influenciado pelos hábitos alimentares regionais. No entanto, outro segmento importante e com grande potencial para exportação é o das pimentas processadas ou industrializadas para a fabricação de produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e ornamentais (CASALI; COUTO, 1984; RIBEIRO *et al.*, 2008).

De acordo com Reifschneider (2000), o agronegócio de pimenta é bastante amplo, pois envolve desde pequenas fábricas artesanais caseiras de conservação até empresas multinacionais que competem na exportação de especiarias e temperos. A perspectiva do mercado de pimentas é praticamente ilimitada pela versatilidade de suas aplicações culinárias, industriais, farmacêuticas e ornamentais. A crescente demanda pelo produto tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas, tanto doces quanto picantes, um grande segmento de hortaliças no país. Além do mercado interno, no Brasil, parte da produção brasileira é exportada de diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais (EMBRAPA, 2008).

O mercado de pimenta hortícola, cujo mercado é estimado em 80 milhões de reais ao ano, é um segmento com grande potencial de crescimento em todos os continentes (EMBRAPA, 2008). De acordo com Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes, o Brasil cultivou uma área de 1979,89 hectares de pimentas (doce e arida) e comercializou o equivalente a 590,12 kg de sementes (ABCSEM, 2011).

De acordo com o Trade Information Brief (TIB, 2005), a razão do aumento crescente do consumo de pimentas, nos países desenvolvidos, está associada a uma crescente conscientização dos benefícios de uma dieta salutar, à crescente migração das populações que partilham seus hábitos alimentares e ao aumento da renda. Nos países em desenvolvimento, o aumento do consumo está relacionado ao aumento da produção, como reflexo da crescente industrialização e urbanização. Apesar de sua importância, os dados estatísticos de produção e comercialização de pimenta hortícola no Brasil são escassos e a pouca informação disponível não reflete a realidade econômica dessa

hortaliça, visto que grande parte da produção é comercializada em mercados regionais e locais que não fazem parte das estatísticas (DOMENICO *et al.*, 2010).

Na Amazônia brasileira, embora o sistema de manejo integrado possa ser considerado fraco do ponto de vista da comercialização interna e externa, o cultivo de pimentas do gênero *Capsicum* pode ser uma importante fonte alternativa a geração recursos para as populações agrícolas (tradicionais e não tradicionais) da região. Isto porque há um rico potencial muito pouco conhecido e/ou explorado de forma organizada, embora se admita que o Brasil e, principalmente a Amazônia, seja um importante centro secundário de espécies domesticadas (REIFSCHNEIDER, 2000).

2.3.3 Valor Nutricional das Pimentas

Os frutos de *Capsicum* são fontes importantes de três antioxidantes naturais, as vitaminas C e E e os carotenóides. É importante ressaltar que a secagem e o cozimento dos frutos levam à perda de vitamina C, sendo praticamente 100% no primeiro caso e 60% quando cozidos (RIBEIRO *et al.*, 2008). Os frutos maduros de diferentes variedades de pimenta concentram altas quantidades dos carotenoides capsantina e capsorubina, que são sintetizados nos cloroplastos e têm a função de proteger o aparato fotossintético das reações oxidativas deletérias (CAMARA *et al.*, 1982) e conferir coloração vermelha e amarela aos frutos (NUEZ *et al.*, 1996). As pimentas são, também, fontes de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, B-6 e ácido fólico) e A, e ainda de fibras, elementos essenciais no processo da digestão e prevenção de doenças intestinais (REIFSCHNEIDER, 2000).

Tão importantes quanto os outros elementos, as antocianinas, que são compostos da classe dos flavonóides encontrados nas pimentas, são responsáveis pela coloração vermelha ou roxa em órgãos como frutos, flores, talos e folhas. No caso de *Capsicum*, geralmente imprimem coloração nos tecidos, o que torna as plantas mais atrativas do ponto de vista ornamental (OCHOA-ALEJO; RAMÍREZ-MALAGÓN, 2001)

2.3.4 Aspectos Morfológicos do Gênero *Capsicum*

O nome do gênero *Capsicum* deriva do grego: Kapsó (picar) ou Kapsakes (cápsulas) e a palavra pimenta aparece na língua castelhana no século XIII, derivada do latim pigmenta, plural de pigmentum, corante (NUEZ *et al.*, 1996). As pimentas hortícolas pertencem à família das Solanaceas e ao gênero *Capsicum*, assim denominadas para diferenciá-las da pimenta do reino (*P. nigrum* L.), da pimenta rosa (*Schinus molle* L.) e da pimenta da jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl.). Todas elas, embora chamadas de pimentas e utilizadas como condimento, não possuem parentesco entre si e cada qual apresenta propriedades químicas distintas (CARVALHO *et al.*, 2006).

Devido à grande variação na forma, tamanho e cor dos frutos de *Capsicum*, assim como nos demais componentes morfológicos desse gênero, uma maneira prática de organizar essa enorme diversidade é pelo agrupamento em espécie, variedade e cultivar. Além desses agrupamentos usuais, as pimentas também podem ser englobadas em complexos de espécies, que reúnem os indivíduos passíveis de cruzamento entre si. Esse arranjo é importante, pois se trata da primeira aproximação entre as espécies selvagens. Atualmente, estão estabelecidos três complexos: 1) *C. annuum*, que inclui as espécies *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*; 2) *C. baccatum*, formado apenas pela

espécie *C. baccatum* var. *pendulum*; e 3) *C. pubescens*, também constituído de somente uma espécie, *C. pubescens* (BOSLAND; VOTAVA, 1999).

Ao analisar as cinco espécies cultivadas no Brasil predomina-se *C. chinense* cujo cultivo e consumo predominam na região Norte. Destacam-se pela grande variabilidade no formato, coloração e pungência dos frutos (RUFINO; PENTEADO, 2006; MOREIRA *et al.*, 2006). Nascimento Filho *et al.* (2007) em trabalho realizado em Roraima verificaram que a espécie *C. chinense* foi predominante entre os 78 morfotipos identificados em áreas indígenas e, que a mesma espécie é apontada por migrantes, derivados de diversas regiões do país, como a mais cultivada.

A denominação *Capsicum chinense* foi dada pelo físico e botânico holandês Nikolaus Joseph vonJacquin e foi registrada no Hortus Botanicus Vindo bonensis, 3: 38, pl. 67 como *Capsicum chinense* Jacquin, 1776. Embora, na época, já se soubesse que todas as espécies de *Capsicum* tinham o hemisfério ocidental como centro de origem, equivocadamente Jacquin deu-lhe o nome de *C. chinense* por considerar a espécie como sendo originária da China (ANDREWS, 1984; BOSLAND; VOTAVA, 1999).

O International Plant Genetic Resource Institute (IPGRI, 1995), órgão da FAO atualmente denominado de Biodiversity International, propôs uma listagem de descritores morfológicos e fenológicos para caracterizar o gênero *Capsicum*. Os descritores mais importantes na diferenciação de *C. chinense* são a coloração da corola e a presença de constrição anelar localizada no cálice em sua união com o pedicelo. Diversos autores concordam com estas distinções morfológicas entre *C. chinense* e as demais espécies cultivadas (NUEZ *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2003).

Segundo Smith e Heiser (1957) a espécie apresenta a seguinte descrição botânica: *C. chinense* Jacquin (syn. *C. sinense*), plantas arbustivas com 0,45 a 0,76 m de altura; hábito ereto, prostrado ou compacto; folhas e ramos essencialmente glabros, pequena pubescência, folhas ovadas a ovado-lanceoladas de 10,5 cm, largas, macias ou rugosas, de tonalidade verde claro a escuro; as flores aparecem de 3 a 5 por nó, exceto em plantas depauperadas; o pedicelo é pendente, raramente ereto, relativamente curto e grosso na antese; cálice sem dentes com forte constrição na base (conforme a Figura 3) e raramente sem constrição; corola verde-amarelada ou raramente esbranquiçada, medindo de 0,5 a 1,0 cm de comprimento; anteras azuis, púrpuras ou amareladas. De modo geral, apresentam flores hermafroditas com autofecundação sendo, portanto, autocompatível.

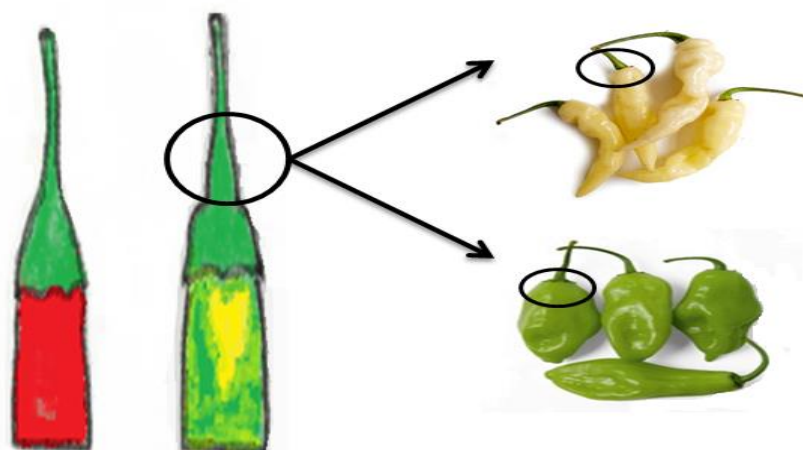


Figura 3- Cálice com apresentação de constrição anelar (direita), característica específica do gênero *Capsicum chinense*. Fonte: Adaptado de Luz, (2007).

Entretanto os níveis de polinização cruzada variam entre e dentro das espécies (0,5 a 70%), o que possibilita colocá-las no grupo intermediário entre alógamas e autógamias (CASALI; COUTO, 1984). Costa *et al.* (2008) afirmaram que a autopolinização natural em *C. chinense* é eficiente, sem dependência de agentes polinizadores e os acessos avaliados apresentaram o comportamento de plantas autógamias. Apresentam frutos de polpa firme que variam de 1,0 a 12,0 cm de comprimento, com formas variáveis, de esféricas a alongadas, pouco ou muito enrugados, de cores salmão, laranja, amarela, vermelha ou marrom. Sementes cor de palha com margem ondulada e raramente suave, número cromossômico $2n = 24$. O sistema radicular é pivotante, as folhas apresentam cor verde, em ambientes naturais tem ciclo de vida perene embora em muitas partes do mundo se comportem como anuais (RIBEIRO *et al.*, 2008), principalmente, quando cultivadas para fins comerciais, pelo fato de terem maior número de frutos no primeiro ano.

2.4 Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, com funções elementares para o seu crescimento e reprodução, são originados em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV atuando no vegetal como uma espécie de bloqueadores solares naturais. Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicais e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (MELO *et al* 2003). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (RAMALHO *et al* 2005).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (LU *et al* 2001), conforme a figura 4. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (NACZK M.; *et al.*; 2004).

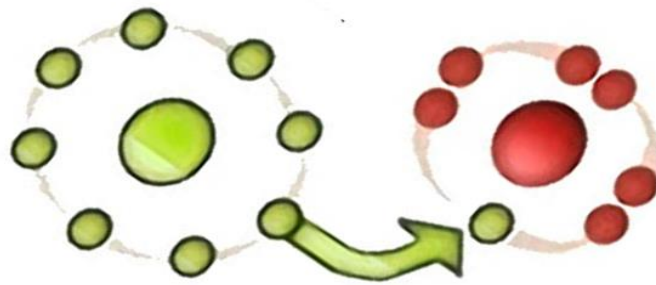


Figura 4 - Mecanismo de ação antioxidante neutralizadora de radical livre.

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio. Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (NAMIKI M. *et al.*, 1990; KAWAKISHI *et al.*, 1995).

3. OBJETIVO GERAL

Contribuição ao conhecimento do perfil químico das espécies *Capsicum chinense* – pimentas Murupi, consumidas na região Amazônica, visando avaliar as classes presentes e detectar o potencial antioxidante dessas substâncias, bem como o emprego de bioensaios que avaliam a toxidez desses extratos.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Preparar os extratos hidroalcoólicos das pimentas Murupis;
- b) Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos visando identificar as classes de metabólitos especiais em cada espécie;
- c) Determinar o conteúdo de fenóis totais para cada espécie;
- d) Determinar o teor de flavonoides para cada extrato;
- e) Avaliar a atividade anti-oxidante através do método do DPPH para cada extrato;
- f) Avaliar a toxidez geral através do ensaio de letalidade da *Artemia salina* Leach.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condução do experimento e obtenção do material vegetal

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ, laboratórios 29, 55 e 61. As pimentas Murupi, *in natura*, foram obtidas no mercado popular de Manaus, no dia 10 de dezembro de 2014.

4.2. Obtenção das Pimentas, extratos hidro-alcoólicos e extratos secos

As pimentas Murupi I (pimenta Murupi do morfotipo alongado) e II (pimenta Murupi do morfotipo de Cheiro) *in natura* foram inicialmente, pesadas e processadas, por meio da picagem do material vegetal, retirando o receptáculo e as sementes de ambas pimentas, pois o material de estudo concentrou-se apenas nos tegumentos desses frutos. que foi acondicionado em frascos de vidro na presença da mistura de etanol:água 90% (v/v) e mantido sob temperatura ambiente, segundo a metodologia adaptada da literatura (COSTA *et al.*, 1995). Após este beneficiamento e seleção dos indivíduos, foram pesadas as partes correspondentes aos tegumentos desses frutos que foram processadas em porções menores, afim de obter maior área de superfície de contato ao realizar o processo de maceração por duas semanas com uma mistura de solventes de etanol/água na proporção 9:1 (v/v). A Figura 4 ilustra a pesagem do material vegetal e a preparação do extrato.



Figura 5 - Pesagem do material vegetal^(a) e preparação do extrato hidro alcoólico^(b).
Fonte: Próprio autor.

Após obtenção dos extratos hidroalcoólicos, os mesmos foram filtrados, conduzidos ao rota-evaporador para retirada do solvente sob temperatura inferior a 40 °C para não degradar classes de metabólitos presentes nas amostras de ambos os extratos, e em seguida, foram liofilizados para a obtenção dos extratos brutos e secos, com auxílio do Liofilizador L101 da marca LIOTOP. A Figura 5 mostra o fluxograma utilizado para a obtenção dos extratos secos.

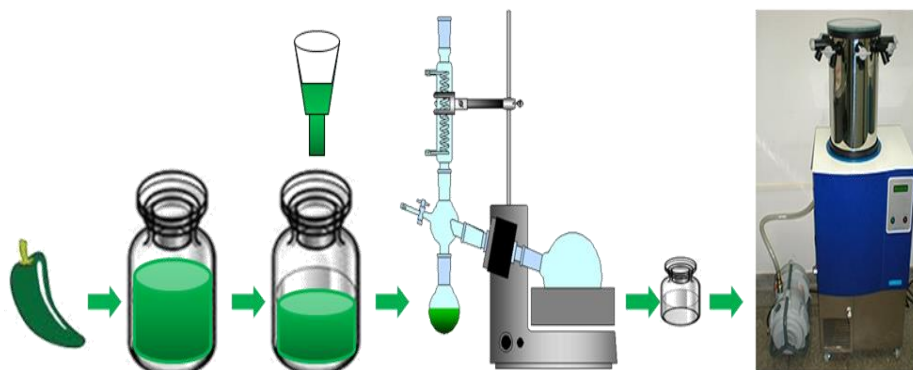


Figura 6 - Fluxograma de obtenção de extratos brutos e secos. Fonte: Próprio autor.

4.3. Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada segundo a metodologia convencional em fitoquímica (MATOS, 1998; WAGNER; BLADT, 1996; COSTA, 2001; SIMÕES *et al.*, 2004) utilizando-se em torno de 2 mg de cada extrato seco na presença dos reagentes específicos para identificar cada classe de metabólitos especiais. A Figura 6 ilustra o fluxograma utilizado para a realização da prospecção fitoquímica.

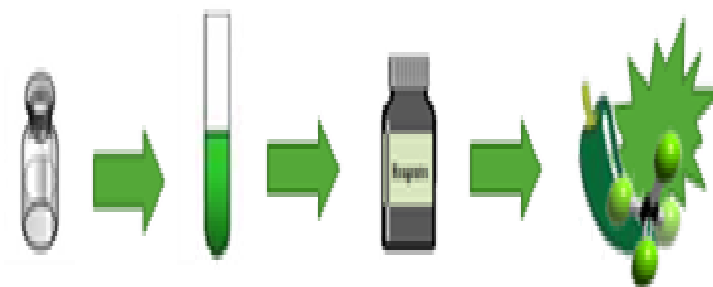


Figura 7 - Fluxograma para identificar classes de metabólitos especiais. Fonte: Próprio autor.

A Tabela 1 mostra os reagentes e quantidades utilizados para avaliar as principais classes de metabólitos especiais presentes nas pimentas Murupis.

Tabela 1 - Metodologia para triagem Fitoquímica (adaptado de Matos *et al.* 1988 e de Costa *et al.* 1995)

Classe Química	Reagentes	Resultado a ser observado
Alcalóides	Reativos de Hager e Mayer	Turvação Branca indica Alcalóides
	Reativos de Dragendorff	Coloração Alaranjada indica Alcalóides
Triterpenóides e Esteróides	Anidrido Acético (1 gota) Ácido Sulfúrico (2 gotas)	Cor azul-esverdeada indica esteróides Cor vermelha indica triterpenóides
Saponinas	Água Destilada	Após agitação (30 mim) o aparecimento de espuma indica a presença de Saponinas.
Cumarinas	Solução de KOH 10% (1 gota)	Cor azul sob luz UV 365 nm indica Cumarinas
Compostos Fenólicos	Solução de Cloreto de Ferro 2%	Coloração Azul indica presença de Compostos Fenólicos
Taninos	Solução de Cloreto de Ferro 2%	Precipitado azul indica Taninos Pirogálicos Precipitado verde, Taninos Condensados
Flavonoídes	Solução de Cloreto de Alumínio 5%	Coloração amarelada sob luz UV de 365 nm indica a presença de flavonoídes
Antraquinonas	Solução de Hidróxido de Sódio 0,5 mol. L ⁻¹	Coloração vermelha indica Antraquinonas
Antocianidinas e Chalconas	Tubo 1: foi acidificado com HCl 0,5 mol. L ⁻¹ (pH:3)	Coloração Vermelha, Lilás e Azul Púrpura nos tubos 1,2,3, indica a presença de Antocianidinas.
	Tubo 2 e 3: foram alcalinizados com Hidróxido de Sódio 0,5 mol. L ⁻¹ (pH: 8 e pH:11)	Enquanto a mesma coloração nos tubos 1 e 3, indica presença de Chalconas
Leucoantocianidinas e Catequinas	Foi acidificado com HCl 0,5 mol. L ⁻¹ (pH:3)	Coloração Vermelha, após o aquecimento indica Leucoantocianidinas. Coloração Amarela

		indica presença de Catequinas
Flavononas	Fita de Magnésio Metálico e Ácido Clorídrico Concentrado (1 gota)	Coloração Vermelha indica Flavononas

*Em função da natureza dos Testes de Triagem Fitoquímica alguns foram realizados em tubo de ensaio e outros em tiras de papel filtro.

4.4. Determinação do Teor de Fenóis Totais

O reagente de Folin-Denis foi utilizado para a quantificação dos fenóis totais. Solubilizou-se 100 mg do extrato das pimentas I e II em 10 mL de água Milli-Q.

4.4.1. Ensaio dos fenóis totais

A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 µL) da solução estoque de extratos das pimentas I e II, adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Denis, após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14% (p/v). Manteve-se a mistura incubada por 2 h. Em seguida, fez-se a medida de sua absorbância a 760 nm, utilizando a água como branco (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007; KÜÇÜK *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2007). Para efetuar a leitura de absorbância foi utilizado o Espectrofômetro UV-Visível, da marca Nova cujo modelo é 2000 UV. A Figura 7 mostra o fluxograma utilizado para o experimento dos fenóis totais.

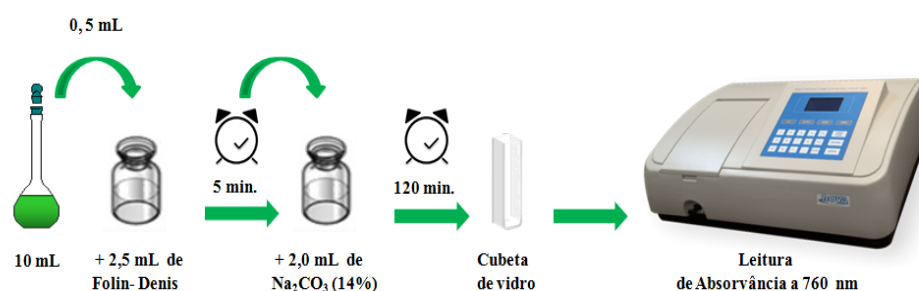


Figura 8 - Fluxograma para realização do ensaio de fenóis totais. Fonte: Próprio autor.

4.4.3. Preparo da curva analítica com ácido gálico

Foi obtida uma curva analítica a partir da solução aquosa padrão de ácido gálico (1 mg/mL \equiv 0,0059 mM), proposta por anteriormente (Lianda, 2009), utilizando-se alíquotas de diferentes volumes (2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 µL) que foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e, após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14%. As leituras foram feitas contra um branco de água. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin® 8.0 (DEQUIM/UFRRJ), onde foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta, em função do modelo $[y = a + b.x]$, relacionando concentração de ácido gálico *versus* absorbância de cada leitura a 760 nm. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras, onde se substituiu pela média da absorbância de cada amostra de extrato para se calcular a concentração.

4.5. Determinação do Teor de Flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA *et al.*, 2005) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. A 3,0 mL da solução de extrato das pimentas Murupi I e II em metanol (grau espectroscópico) adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado (Vetec). Após 30 minutos em repouso, leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco constituindo 3,0 mL de extrato misturados a 3,0 mL de metanol sem cloreto de alumínio (MEDA *et al.*; 2005; AHN *et al.*; 2007). Para efetuar a leitura de absorvância foi utilizado o espectrofômetro UV-Visível, da marca Nova cujo modelo é 2000 UV. A Figura 8 mostra o fluxograma para a realização do ensaio do teor de flavonoides.



Figura 9 - Fluxograma para realização do ensaio de flavonoides. Fonte: Próprio autor.

4.5.1 Preparo da curva analítica com quercetina

A curva analítica foi feita a partir de uma solução padrão de quercetina em metanol (1,78 mg/mL \approx 0,0059 mM), proposta por anteriormente (LIANDA, 2009). Em seguida foram coletadas alíquotas da solução original com diferentes volumes (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μ L), às quais foram acrescentados 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco constituindo de 3,0 mL de solução de extrato bruto misturados a 3,0 mL de metanol sem cloreto de alumínio.

A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 8.0® (DEQUIM/UFRRJ), efetuando-se a regressão linear sendo obtida a equação da reta, em função do modelo [y = a + b.x], relacionando concentração de quercetina contra absorvância de cada leitura a 415 nm. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nas amostras, onde se substituiu y pela média da absorvância de cada extrato para se calcular x (concentração).

4.6 Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (MENSOR *et al.*, 2001). Na presença de um antioxidante, a coloração púrpura do DPPH decai, e a mudança de absorvância pode ser lida espectrofotometricamente (PÉREZ *et al.*, 2007). Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos, bem como dos padrões comerciais, foi utilizado solução em metanol de 0,3 mM de DPPH.

Portanto, para determinação da atividade antioxidante foram preparadas soluções metanólicas estoque dos extratos de pimenta I e II, nas concentrações de 100 µM; dos extratos (em metanol) na concentração de 0,1 mg/mL (100 µg/mL). A partir da concentração inicial foram feitas diluições (100, 50, 25, 10, 1 e 0,1 µM de padrão, ou µg/mL do extrato) para fornecer a faixa de melhor atividade. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços de 100 µL de volume, onde foram adicionados 71 µL da amostra ou do padrão e 29 µL da solução de DPPH, que correspondeu aos seis pontos nas concentrações de 71; 35,5; 17,75; 7,1; 0,71 e 0,071 µg/mL de amostra ou µM de padrão ou mg/mL de extrato. As leituras foram feitas após 30 minutos de incubação no escuro, em espectrofotômetro ELISA a 490 nm.

O branco específico da amostra foi determinado usando 29 µL de metanol e 71 µL da amostra de cada concentração, e o controle positivo com 29 µL de DPPH e 71 µL de metanol. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, em um leitor de microplacas de ELISA (Bio - Rad modelo leitor de microplacas 680). A Figura 9 mostra as concentrações empregadas para o ensaio da atividade anti-oxidante com o DPPH.

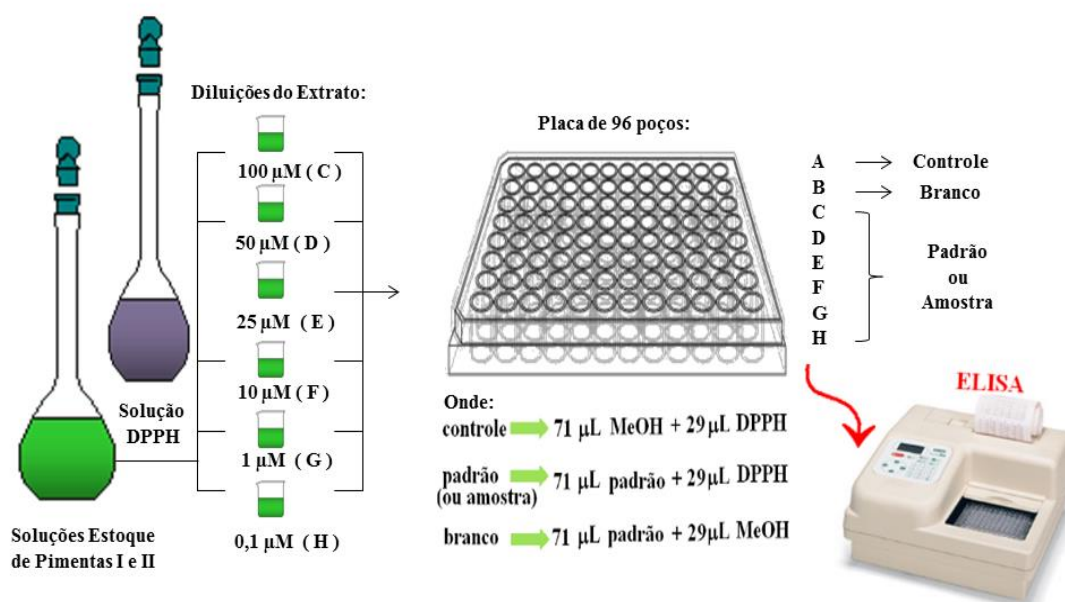


Figura 10 - Concentrações de extratos de pimenta para realização do ensaio do DPPH. Fonte: Próprio autor.

A porcentagem de atividade de sequestrante (%AA) foi determinada segundo a Equação 1 (MENSOR *et al.*, 2001).

$$\%AA = \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco})]}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

onde,

Abs = absorvância lida em 490 nm após 30 minutos de reação.

$Abs_{amostra}$ = absorvância da solução de DPPH e a amostra a ser analisada (extrato).

$Abs_{controle}$ = absorvância da solução de DPPH e metanol (solução controle positivo).

Abs_{branco} = absorvância da solução amostra (extrato) e metanol.

A Figura 10 apresenta o fluxograma para o ensaio da atividade anti-oxidante com o DPPH. A atividade sequestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de CE_{50} (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH), através da média obtida nos gráficos que relacionam o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

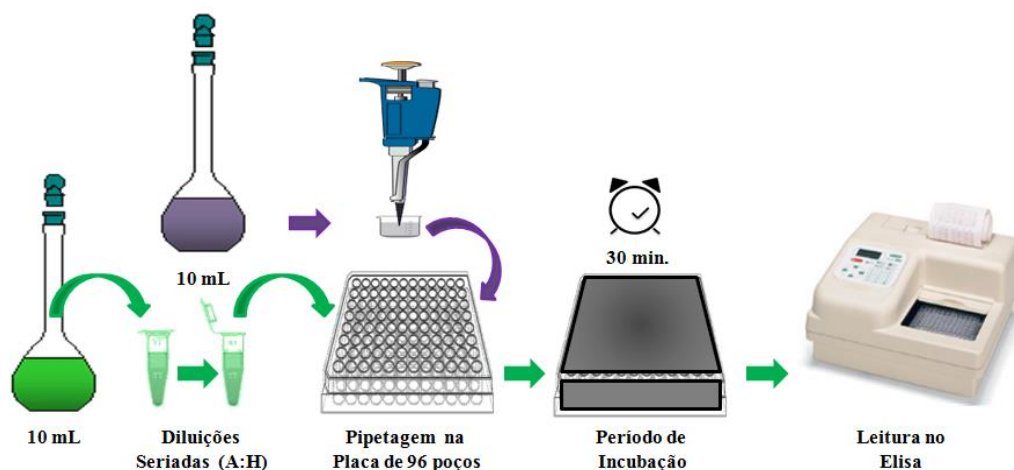


Figura 11 - Fluxograma para realização do ensaio do DPPH. Fonte: Próprio autor.

4.7. Avaliação de toxidez frente a *Artemia salina* Leach

Para viabilizar o ensaio de toxidez, preparou-se uma solução de água do mar artificial (salina), contendo (24 g de NaCl, 1,5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,10 g de KBr, 0,70 g de KCl, 4 g de Na_2SO_4 e 11 g de $NaHCO_3$ e 11 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ para 1 L de solução salina), que foi empregada como meio de cultura dos cistos do microcrustáceo *Artemia salina*. Após obter esta solução salina, acrescentou-a no criadouro, feito com caixas de acrílico do tipo gerbox, junto aos cistos até cobri-las totalmente. A porção escura do criadouro onde foram alocadas os cistos foi coberta com papel alumínio e direcionou-se a luz a parte clara, inserindo uma gaze para evitar que haja contaminantes, onde após a eclosão, os cistos migram por fototropismo. Após 48 horas da eclosão os microcrustáceos foram empregados para avaliação da toxidez, de acordo com a figura 12.

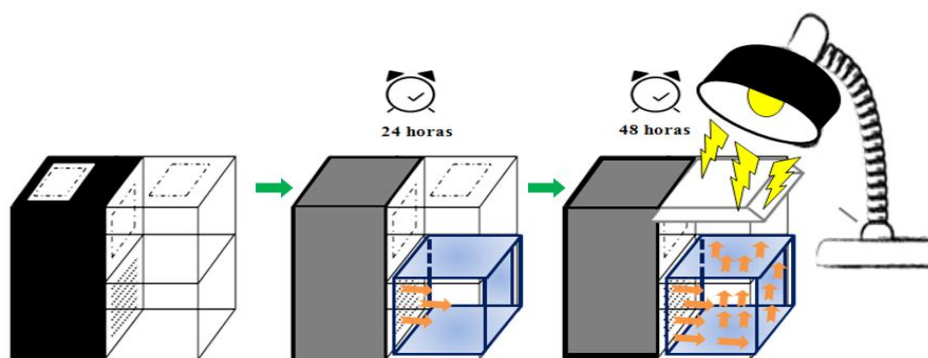


Figura 12 - Fluxograma para obtenção dos microcrustáceos. Fonte: Próprio autor.

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reproduzíveis. (MACIEL *et. al* 2002). Por estes, atributos foram considerados essenciais para realização deste trabalho.

4.7.1 Procedimento para o Ensaio de Toxidez

Foram pesadas 0,125 g dos extratos e solubilizados, transferiu-se para um balão de 25 mL e completou-se o volume com água destilada. Desta solução, denominada estoque, retiraram-se 5 alíquotas de volumes diferentes que variam de 400 μ L a 1000 μ L. Transferiu-se à cinco tubos de ensaio, sendo que cada dose foi preparada em quintuplicata.

A cada tubo, com as suas respectivas doses da solução estoque, foram adicionados a solução salina até o volume de 5 mL através de uma pipeta automática. Para fins de comparação procedeu o uso da solução salina pura como controle, também preparada em quintuplicata.

Utilizando-se uma pipeta Pasteur, coletou-se 10 náuplios que foram colocadas nos tubos de ensaio. Estas ficaram expostas aos extratos a ao controle por 24 horas, após este período realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos, conforme a Figura 13.

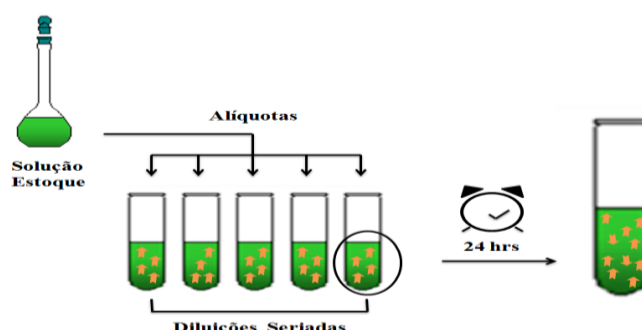


Figura 13 - Metodologia para emprego de ensaio para avaliar a bioatividade dos extratos frente a *Artemia salina* Leach. Fonte: Próprio autor.

4.7.2 Cálculos

Para o cálculo da dose letal que mata 50% das larvas (DL_{50}), utilizou-se a concentração expressa por meio do log da dose em função da percentagem de microcrustáceos mortos. A partir dos gráficos de concentração *versus* percentual de larvas mortas fez-se a regressão linear das curvas obtidas, com o programa Origin® 8.0, e utilizou-se a equação da reta para se calcular a concentração de DL_{50} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos Extratos

Foram obtidos os extratos com volume final de 4 litros e, após 2 semanas foram evaporados em rotaevaporador à vácuo. A massa inicial das pimentas I e II, 259,58g e 252,14 g respectivamente, obtendo-se ao final do processo de extração 2,22 g e 0,78g para cada uma das pimentas. Assim, os rendimentos obtidos para os extratos secos foram 0,85% e 0,30%, para as pimentas I e II respectivamente.

5.2 Principais Classes dos Metabólitos Especiais

A triagem fitoquímica para os extratos em etanol/água das pimentas murupis I e II apontou os resultados, expressos na Tabela 2. A triagem fitoquímica foi realizada com uso de reagentes específicos para cada amostra, em tubos de ensaio e/ou fitas de papel filtro em função da natureza dos testes. Foi empregada uma escala empírica para mensurar o quanto se expressou a classe química em função das reações colorimétricas realizadas. Quanto à escala empregada consistiu em utilizar os seguintes padrões:

- negativo: para ausência de reação;
- + fracamente positivo;
- ++ médio/positivo;
- +++ positivo;
- ++++ fortemente positivo.

Contudo, a identificação das classes de metabólitos especiais em diferentes espécies de plantas tem contribuído para subsidiar estudos de classificação sistemática de plantas, da quimiosistemática, ecologia e farmacologia. Sendo extremamente crucial obter essas informações para assegurar proteção e conservação da espécie, influências na quantidade de metabólitos produzidos e elaboração de estratégias de otimização destes recursos. Todos esses questionamentos acerca do perfil químico de uma espécie,

podem ser elucidados frente à reação das amostras com reagentes específicos na triagem fitoquímica, que apontaram o efeito positivo ou negativo para a respectiva classe química, conforme a Tabela 1.

Tabela 2 - Classes de metabólitos especiais presentes em duas espécies de Pimenta da Amazônia (Murupi) extraídas em extratos etanol + água (9:1, v/v)

Constituintes	Espécies	
	Pimenta I	Pimenta II
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Taninos Condensados	++	-
Flavonóis, flavonas, Flavanóis e, ou, xantonas	++++	++++
Taninos Catéquicos	-	-
Antocianinas e antocianidinas	-	-
Flavononóis	++	+++
Chalconas	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	++++	++++
Resinas	-	-
Esteróides livres	+	+
Triterpenóides livres	+	++++
Saponinas	+	-
Bases quartenárias	-	-
Alcalóides	-	+
Ácidos Orgânicos livres	++	-
Hidroxiquinonas	-	+++
Antranóis	-	++++
Coumarinas	-	-
Agliconasesteróides ou triterpenóides	++	++++
Agliconas flavonoides	-	++
Ácidos Orgânicos Fortes	-	+

Fonte: Próprio autor.

A diferença entre os dois tipos de pimentas Murupi, também chamadas de cheiro, foi relativa à intensidade dos produtos detectados nas reações para indicação da classe de metabólitos. No caso da pimenta Murupi (I) os resultados foram mais intensos

para as classes dos flavonóis, flavonas, flavanóis, e ou xantonas, indicado uma maior concentração desses metabólitos em sua constituição. Enquanto, que para a pimenta Murupi (II) as classes que mais se expressaram foram as flavonas, flavonóis e xantonas, triterpenóides livres e antranóis.

Outra característica observada que está associada a presença dos alcaloides, que por sua vez está associada a presença de capsaicina, sendo que apenas a pimenta murupi II demonstrou presença destes metabólitos, embora de maneira fracamente positiva. A diversidade de valores encontrados para o conteúdo de capsaicina é explicada por alguns autores como uma resposta afetada pela interação genótipo-ambiente, algumas vezes com predomínio dos fatores ambientais. A mesma cultivar de pimenta plantada em diferentes locais apresenta diferentes conteúdos de capsaicinóides, pois qualquer estresse à planta altera a pungência do fruto (BOSLAND; VOTAVA, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2008; BORGES-GOMÉZ *et al.*, 2010).

5.3 Avaliação do Teor de Fenóis e Flavonóides

5.3.1 Fenóis totais

Os teores de fenóis totais dos extratos de pimentas foram quantificados através do método de Folin-Denis, utilizando o ácido gálico como padrão de referência, sendo os valores expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g para cada extrato de pimenta para estas determinações, utilizando triplicatas para cada amostra.

A curva analítica para a determinação indireta dos totais de fenóis dos extratos obtidos foi elaborada utilizando o ácido gálico na faixa de concentração de 0 – 0,025 mg/mL como padrão. Na Tabela 3, estão expressos os dados que geraram o gráfico.

Tabela 3 - Valores obtidos nas diferentes concentrações da solução do padrão de ácido gálico (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis

Volume (µL)	Ácido Gálico (mg/mL)	Leitura UV – Abs. (760 nm)			Média Abs. ± DP
		1º	2º	3º	
2	2,6	0,1470	0,1470	0,1380	0,1440 ± 0,00520
6	7,8	0,2640	0,2950	0,2460	0,2683 ± 0,02479
8	10,5	0,3090	0,3500	0,3110	0,3233 ± 0,02312
10	13	0,3555	0,4220	0,3920	0,3898 ± 0,03330
20	26	0,6220	0,5970	0,6190	0,6127 ± 0,01365
30	39	0,8220	0,9660	0,9550	0,9143 ± 0,08015
50	64,8	1,4350	1,5940	1,4640	1,4977 ± 0,08468
75	96,7	2,0760	2,3130	2,1090	2,1660 ± 0,12837
100	128,2	2,7550	3,0120	2,7570	2,8413 ± 0,14781

Fonte: LIANDA (2009).

Utilizando-se os valores obtidos na Tabela 3, foi confeccionada a curva analítica oriunda das leituras de absorvâncias (UV a 760 nm) obtidas para diferentes concentrações da solução padrão, afim de investigar a relação existente entre as

concentrações do ácido gálico frente as leituras de absorvância (760 nm), após o emprego do reagente Folin-Denis.

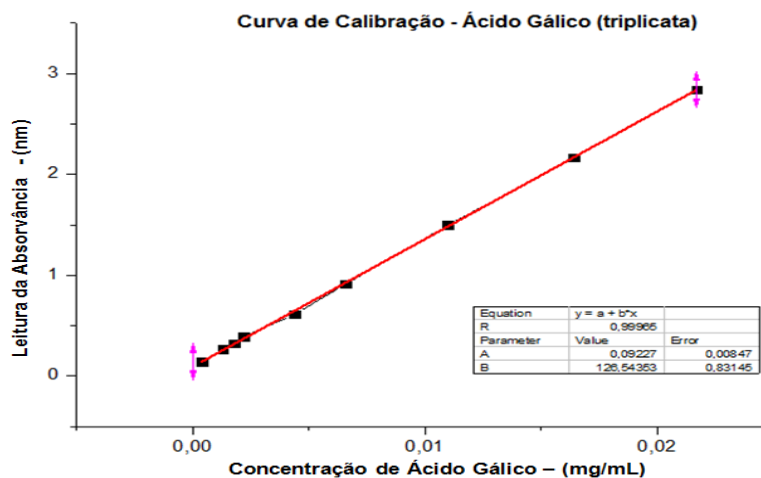


Figura 14 - Curva de calibração de Ácido Gálico (triplicata).

Fonte: LIANDA (2009).

Em função do gráfico obteve-se a reta dada pela Equação 2.

$$Y = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X \quad (2)$$

Onde: R = 0,99985, p < 0,0001 e n = 9.

Sendo R: coeficiente de correlação linear; p: probabilidade e n: número de pontos

O valor de R = 0,99985 para estimar a equação da reta, obtida por regressão linear, indicou uma boa correlação entre as concentrações e a absorvância em 760 nm expressando confiança na curva analítica obtida. Após obter a equação da reta, foram realizados os ensaios com os extratos brutos em triplicata que obtiveram com referência para a equação proposta pela curva. Portanto, para o cálculo dos totais de fenóis de cada amostra, suas médias de absorvâncias foram substituídas na equação, obtendo-se as respectivas concentrações (mgde ácido gálico/mL), cujos valores foram convertidos em mg de ácido gálico/100g de extratos de pimenta, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores das absorvâncias dos extratos de pimentas frente à solução do padrão de carbonato de sódio (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis

	Leitura UV - Abs. (760 nm)			Média Abs. ± DP
	1º	2º	3º	
Branco	0,076	0,076	0,076	0,076 ± 0,000
Pimenta 1	3,000	3,000	3,000	3,000 ± 0,000
Pimenta 2	1,410	1,410	2,249	1,689 ± 0,484

Fonte: Próprio autor.

Onde se aplicou a Equação 3.

$$Y = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X \quad (3)$$

$$3,000 = 0,09227 + 126,54353 \cdot X$$

$$X = 0,02297 \text{ mg/mL eq. de ácido gálico (Pimenta I)}$$

$$Y = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X$$

$$1,689 = 0,09227 + 126,54353 \cdot X$$

$$X = 0,01262 \text{ mg/mL eq. de ácido gálico (Pimenta II)}$$

Como o valor de **0,02297** mg (de ácido gálico) foi determinado por mL (de solução do ensaio), o cálculo deve considerar que para cada amostra foram utilizados 5,0 mL de solução do ensaio (0,5 mL da solução de extrato + 2,5 mL do Reagente de Folin-Denis + 2,0 mL da solução de carbonato de sódio). Com isso, a massa de ácido gálico que corresponde a essa solução foi 0,1149 mg pimenta I, e de 0,0631 mg para pimenta II. Considerando que nesse volume de 5,0 mL da solução do ensaio há 0,05 g de extrato bruto, conclui-se que em 100 g deste extrato de pimenta I havia **22,98 mg** de ácido gálico, bem como os valores expressos para a pimenta II havia **12,62 mg** de ácido gálico.

Contudo, os teores dos analitos de compostos fenólicos totais nos extratos variam de 12,62 a 22,98 mg EAG/100g de pimenta. Deste modo, é possível expressar de modo indireto que essas frações de pimentas, seja pimenta I ou II são extremamente abundantes quanto se refere à classe dos fenóis, pois o método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm, como pode-se observar na Figura 14, para pimenta I com a coloração azul escura, o mesmo ocorreu para pimenta II produzindo coloração azul clara. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada.

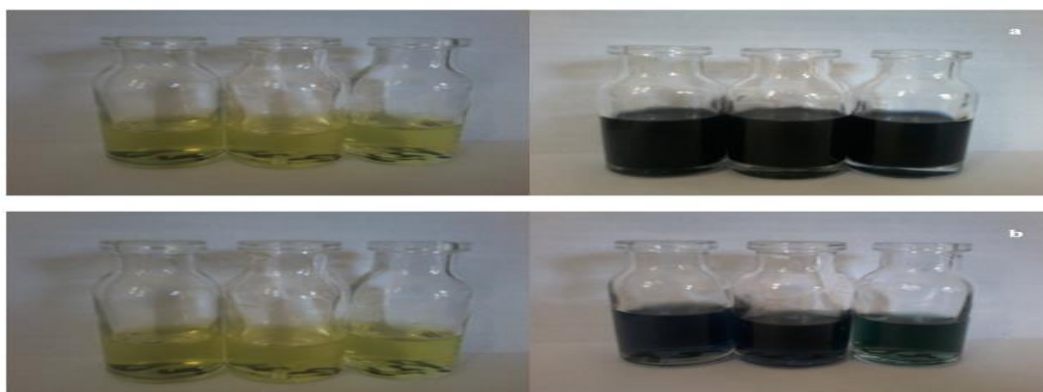


Figura 15 - Reação do reagente Folin-Denis frente aos extratos de Pimenta I^(A) e II^(B) e a solução saturada de carbonato de sódio. Fonte: Próprio autor.

5.3.2 Flavonóides totais

Foram efetuados três ensaios para cada amostra, sendo apresentada a média, expressa em mg de equivalentes de quercertina (EQ)/100 g de extrato de pimenta. Neste sentido, os teores de flavonoides totais dos extratos de pimentas foram mensurados através do método de Folin-Denis, utilizando a quercertina como padrão de referência. Assim, a curva analítica para a determinação indireta dos totais de flavonóides dos extratos obtidos foi elaborada utilizando a quercertina (0 – 0,025 mg/mL) como padrão. Na Tabela 5, estão expressos os dados que geraram o gráfico.

Tabela 5 - Valores obtidos nas diferentes concentrações da solução do padrão de quercertina (triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis

Volume (μ L)	Quercertina (mg/mL)	Leitura UV - Abs. (415nm)			Média Abs. \pm DP
		1°	2°	3°	
2	0,0012	-	0,0570	0,0490	0,0530 \pm 0,0057
4	0,0024	0,1010	0,1030	0,1080	0,1040 \pm 0,0036
6	0,0036	0,1870	-	0,1990	0,1930 \pm 0,0085
8	0,0047	0,2380	0,2260	0,3920	0,2300 \pm 0,0073
10	0,0059	0,3240	0,3390	0,6190	0,3250 \pm 0,0133
15	0,0089	0,4750	0,4860	0,9550	0,4810 \pm 0,0078
20	0,0118	0,6250	0,6580	1,4640	0,6230 \pm 0,0364
25	0,0147	0,8330	0,9110	2,1090	0,8560 \pm 0,0478
30	0,0176	0,9930	1,0280	1,0140	1,0120 \pm 0,0176
40	0,0234	1,4020	1,4210	1,4010	1,4080 \pm 0,0112

Fonte: Lianda, 2009.

Para tal, foi confeccionada a curva analítica oriunda das leituras de absorvâncias (UV a 415 nm) obtidas para diferentes concentrações da solução padrão, afim de investigar a relação existente entre as concentrações da quercetina frente as leituras de absorvância (415 nm), após o emprego do reagente Folin-Denis.

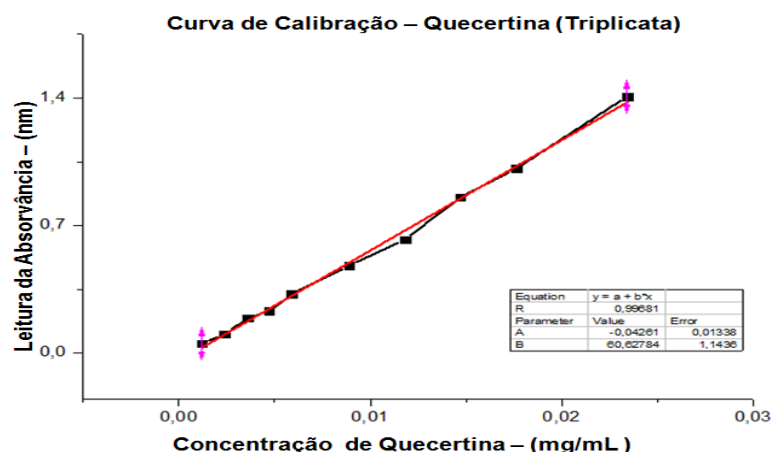


Figura 16 - Curva de calibração de quecertina.

Fonte: LIANDA, 2009.

Em função do gráfico obteve-se a reta dada pela Equação 4.

$$Y = -0,04261(\pm 0,00847) + 60,627843 (\pm 0,83145) X \quad (4)$$

Onde: $R = 0,99681$, $p < 0,0001$ e $n = 9$.

O valor de $R = 0,99681$ para estimar a equação da reta indica o quanto os resultados expressos condizem com a realidade, desta maneira é possível aferir em função do gráfico da curva de calibração da quecertina a concentração existente. Após obter a equação da reta, foram realizados os ensaios com os extratos brutos em triplicata que obtiveram com referência para a equação proposta pela curva. Portanto, para o cálculo dos totais de flavonoides de cada amostra, suas médias de absorvâncias foram substituídas na equação, obtendo-se as respectivas concentrações (mg de quecertina/mL), cujos valores foram convertidos em mg de quecertina/100g de extratos de pimenta, conforme mostrado abaixo:

Tabela 5 - Valores obtidos dos extratos de pimentas frente à solução do padrão de cloreto de alumínio(triplicata e média) após ensaio de Folin-Denis

	Leitura UV - Abs. (415nm)			Média Abs. \pm DP
	1º	2º	3º	
Branco	0,067	0,067	0,067	0,067 \pm 0,000
Pimenta 1	0,691	0,696	0,722	0,703 \pm 0,016
Pimenta 2	0,622	0,684	0,622	0,642 \pm 0,035

Fonte: Próprio autor.

Os valores indicaram maior quantidade de flavonoides na pimenta I em comparação com a pimenta II.

Onde se aplicou a Equação 5.

$$Y = -0,04261 (\pm 0,00847) + 60,6278 (\pm 0,83145) X \quad (5)$$

$$0,703 = -0,04261 + 60,6278 \cdot X$$

$$X = 0,01307 \text{ mg/mL eq. de quecertina (Pimenta I)}$$

$$Y = - 0,04261 (\pm 0,00847) + 60,6278 (\pm 0,83145) X$$

$$0,642 = - 0,04261 + 60,6278. X$$

$$X = 0,01186 \text{ mg/mL eq. de quecertina (Pimenta II)}$$

Como o valor de **0,01307** mg (de quecertina) foi determinado por mL (de solução do ensaio), o cálculo deve considerar que para cada amostra foram utilizados 6,0 mL de solução do ensaio (3,0 mL da solução de extrato + 3,0 mL da solução de cloreto de alumínio). Com isso, a massa de quecertina que corresponde a essa solução foi 0,06534 mg pimenta I, e de 0,05932 mg para pimenta II. Considerando que nesse volume de 6,0 mL da solução do ensaio há 3,0 g de extrato bruto, conclui-se que em 100 g deste extrato de pimenta I havia **13,07 mg** de quecertina, bem como os valores expressos para a pimenta II havia **11,86 mg** de quecertina.

5.4 Ensaio de Atividade Antioxidante

Assim, foram realizados os ensaios para avaliar o potencial antioxidante das pimentas Murupis I e II utilizando o ensaio do DPPH. Ao se observar os resultados obtidos nos ensaios foi possível afirmar que essas pimentas apresentaram atividade antioxidante, conforme observação, primeiramente, qualitativa das placas do tipo Elisa de 96 poços onde houve sequestro do radical DPPH em contato com a solução de extratos, após 30 minutos de incubação seja para pimenta I e II, conforme a Figura 17.

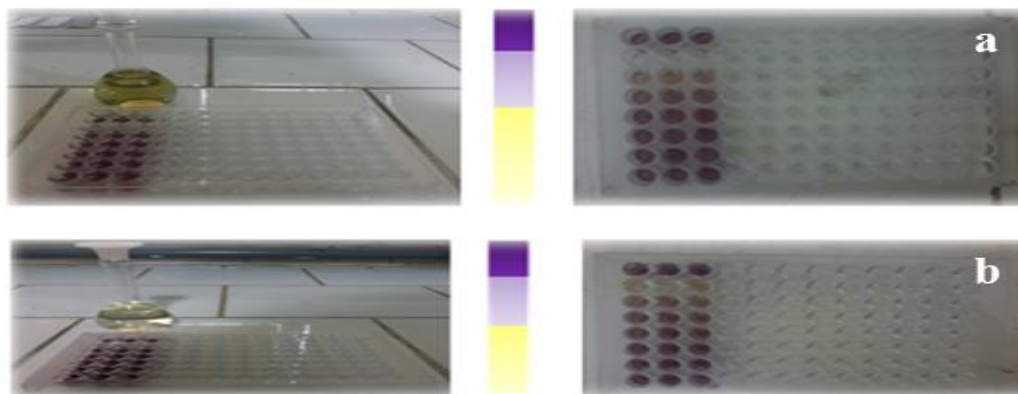


Figura 17 - Percentual de Atividade Antioxidante frente aos extratos de Pimenta I^(a) e II^(b). Fonte: Próprio autor.

Após a realização dos testes, foram efetuados os cálculos afim de mensurar o poder antioxidante de ambas as pimentas. Portanto, os resultados expressos na leitura da placa foram convergidos em percentual de atividade antioxidante de acordo com a equação de Mensor *et al.* 2001. Os gráficos foram confeccionados considerando-se os percentuais de atividade antioxidante *versus* a concentração das pimentas, conforme a Figura 18, utilizando-se o programa Origin® 8.0. As equações obtidas a partir dos gráficos de regressão linear possibilitaram o cálculo dos valores de CE₅₀: 697, 15 ppm e CE₅₀: 868, 21 ppm para as pimentas I e II, respectivamente.

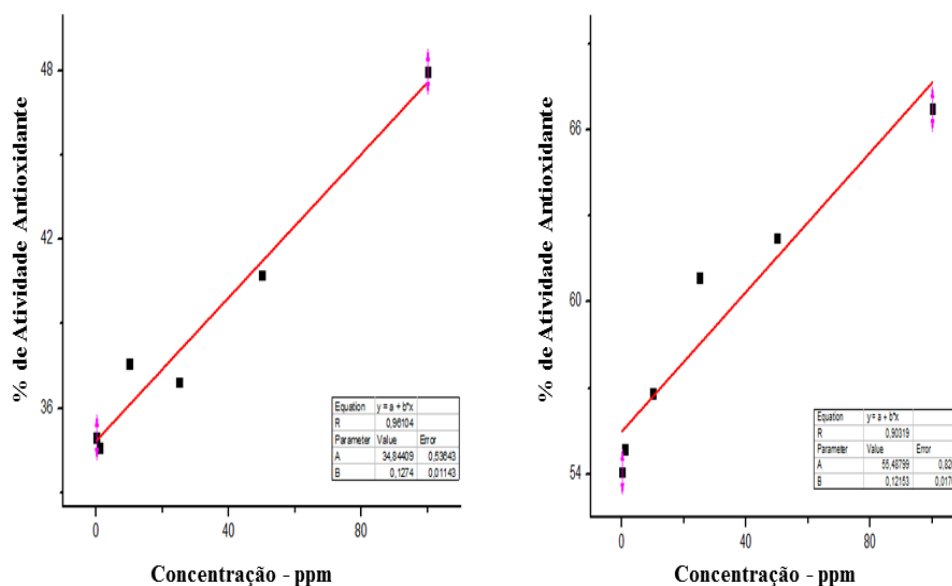


Figura 18 - Curva de obtenção da capacidade antioxidantes dos extratos de pimenta I e I. Fonte: Próprio autor.

Dado que a capacidade antioxidante está associada aos teores de compostos fenólicos nas amostras vegetais (MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008), este fato foi corroborado neste trabalho, visto que as amostras de pimenta I apresentaram teores mais altos de flavonóides 13,07g/mL de EQ quando comparado aos 11, 86 g flavonóides/mL de EQ de pimenta II, em consonância com os valores de AA% 45,15 ppm para pimenta I e 89,22 ppm, sendo a CE₅₀, 697, 15 ppm para pimenta I e 868,21 ppm para pimenta II, conforme a equação 6.

$$CE_{50} = 34,84409 + 0,1274 \cdot X \quad (6)$$

$$\text{Logo: } 50 = 34,84409 + 0,1274 \cdot X$$

$$84,84409/0,1274 = AA\%;$$

Conseqüentemente:

Concentração Efetiva (CE₅₀) = 697, 15 ppm (Pimenta I)

Concentração Efetiva (CE₅₀) = 868,21 ppm (Pimenta II)

5.5 Ensaio Toxidez Geral

5.5.1 *Artemia salina* Leach

Os náuplios que contém os microcrustáceos foram obtidos em comércio especializado em artigos agropecuários, sob o nome comercial de Maramarpet, conforme a Figura 19. Após a exposição por 24 h das artemias às soluções salinas, Figura 20, contendo os extratos das pimentas I e II, foram contados os microcrustáceos vivos e mortos, conforme as Tabelas 6 e 7. Posteriormente, foram confeccionados os

gráficos dos percentuais das lavas vivas *versus* log da dose dos extratos em ppm possibilitando, assim, o cálculo dos valores das DL₅₀.



Figura 19 - Cistos de náuplios de *Artemia salina* Leach. Fonte: Próprio autor.

O ensaio de letalidade da *Artemia salina* permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos e extratos com potencial atividade biológica.

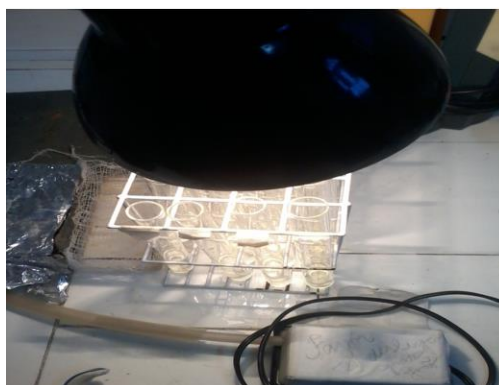


Figura 20 - Diferentes concentrações de extratos expostas à luz e ação da *Artemia salina* Leach. Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Valores de concentração, volume e número de larvas vivas e mortas nos ensaios de toxicidade geral frente a *Artemia salina* Leach para o extrato hidro alcoólico de pimenta I

Concentração (ppm)	Vol. da Solução Estoque (µL)	Larvas Vivas					Larvas Mortas				
		1°	2°	3°	4°	5°	1°	2°	3°	4°	5°
400	556	10	10	10	9	10	6	7	8	4	6
600	834	10	8	10	10	9	10	8	8	8	6
800	1112	10	10	10	9	10	8	8	8	10	8
1000	1390	10	10	8	10	10	8	10	6	10	10
Branco	-	10	10	10	8	8	10	10	10	8	8

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 - Valores de concentração, volume e número de larvas vivas e mortas nos ensaios de toxicidade geral frente a *Artemia salina* Leach para o extrato hidro alcoólico de pimenta II

Concentração (ppm)	Vol. da Solução Estoque (µL)	Larvas Vivas					Larvas Mortas				
		1°	2°	3°	4°	5°	1°	2°	3°	4°	5°
400	556	10	9	10	9	10	6	8	8	6	6
600	834	10	8	10	9	9	10	8	9	6	6
800	1112	10	10	10	10	10	9	9	8	10	8
1000	1390	10	10	8	10	10	9	10	10	7	10
Branco	-	10	10	9	8	8	10	10	9	8	8

Fonte: Próprio autor.

Deste modo, o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* Leach subsidiou informações para construção de curvas ao comparar o percentual dos náuplios mortos (microcrustáceos) *versus* o log da dose ensaiada em cada uma das concentrações propostas que variam de 400 a 1000 ppm, conforme os gráficos na Figura 20 para as pimentas analisadas.

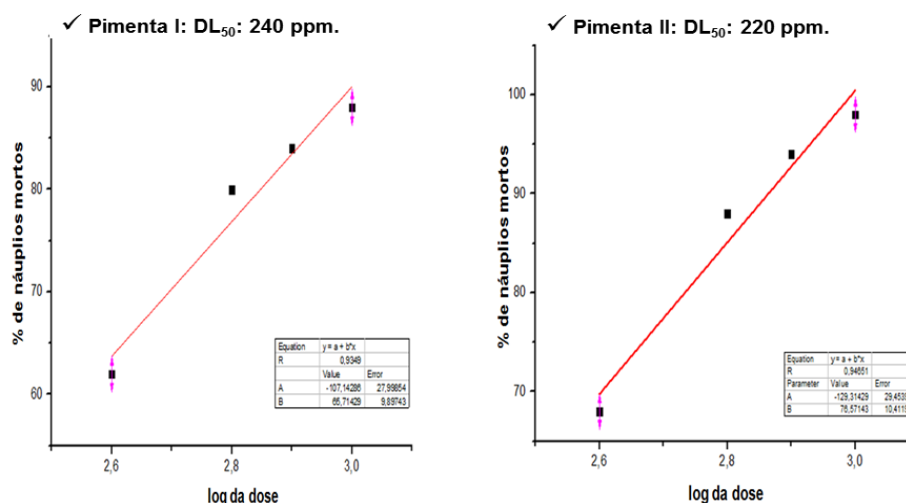


Figura 21 - Curva analítica do log da dose frente o princípio da letalidade da *Artemia salina* Leach. Fonte: Próprio autor.

Após, obter os gráficos foi possível obter as equações da reta, em função do modelo matemático $[y = a + b.x]$ para cada amostra. Os valores de R, neste caso foram Pimenta I = 0,9349 e Pimenta II = 0,9465. A partir das equações obtidas, foi possível calcular os valores das DL₅₀ para os extratos das pimentas, de acordo com a equação 7.

$$\% \text{ de mortos} = 107,20 + 65,71. \log \text{Dose} \quad (7)$$

Logo:

$$50 + 107,20 = 65,71. \log \text{Dose}$$

$$157,20/65,71 = \log \text{Dose};$$

$$\text{Onde: } \log \text{Dose} = 2,38;$$

Consequentemente:

Dose Letal (DL_{50}) = $10^{2,38}$, onde DL_{50} = 240 ppm(Pimenta I)

Dose Letal (DL_{50}) = $10^{2,34}$, onde DL_{50} = 220ppm (Pimenta II)

Os valores obtidos para DL_{50} foram de 240 ppm para pimenta I e, 220 ppm para pimenta II, indicando toxidez geral de acordo com a literatura, pois se apresentaram menores que 1000 ppm. Esses valores indicaram uma potencial atividade citotóxica para os componentes dos extratos em etanol/água das pimentas Murupis. Destacando, a importância da continuidade de estudos fitoquímicos.

5.6 Considerações Finais

Diante do delineamento experimental proposto para este trabalho, foi possível determinar além das classes de metabólitos especiais que mais se expressaram diante a metodologia de prospecção fitoquímica, a determinação de teores de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante, conforme a Tabela 8.

Tabela 8 - Valores obtidos dos extratos de pimentas frente aos ensaios de determinação de Fenóis, Flavonoíde e Atividade Antioxidante

	Fenóis*	Flavonoídes**	Atividade Antioxidante	
			Concentração Atividade Antioxidante	Concentração Efetiva 50%
Pimenta I	22,98 mg/100g EAG	13,07 mg/100g EQ	45, 15 ppm.	697, 15 ppm.
Pimenta II	12,62 mg/100g EAG	11,86 mg/100g EQ	89, 22 ppm.	868, 21ppm.

*Equivalente de Ácido Gálico **Equivalente de Quercertina.

Pautados, nesses valores é possível observar que os extratos de pimenta Murupi I, de modo geral, foram superiores quando comparados com os extratos de pimenta Murupi II, seja para determinação dos fenóis, onde observa-se de modo significativo a presença de fenóis, o mesmo comportamento foi descrito para os teores de flavonoides, porém de modo mais discreto quando analisados como os teores de fenóis. Outro elemento, possível de se extrair é que a atividade antioxidante está associada aos teores de fenóis e flavonoides presentes no extrato, pois ambos os extratos de pimentas I e II possuem atividade antioxidante, essenciais para o combate das espécies reativas de oxigênio por meio do sequestro dessas espécies radiculares na ingestão. No entanto, os extratos de pimenta I reafirmaram sua superioridade ao apresentarem menor valor de

concentração efetiva, ou seja, mesmo em baixas concentrações já atua de modo eficaz inibindo as espécies reativas de oxigênio.

Diante da riqueza, e ausência de estudos acerca da biodiversidade brasileira propor estratégias de valoração do conhecimento etnobotânico acerca das plantas medicinais, dos hábitos alimentares e usos associados às populações tradicionais é de extrema importância, pois a exploração racional de fontes naturais seja para alimentação, avanço social e econômico, são os pilares para promoção do desenvolvimento sustentável assegurando manutenção da saúde, prevenção e cura das doenças.

Portanto, diante deste cenário a busca na educação, ciência, tecnologia e inovação, pautada na preservação da natureza, otimização e valoração dos recursos da natureza, são ferramentas para detecção de substâncias biotivas oriundas do patrimônio das matas, florestas e das populações tradicionais de conhecimento associado. Com isso, é fundamental compreender os mecanismos associados ao metabolismo vegetal, bem como as de classes de substâncias bioativas.

Neste sentido, este trabalho além realizar a determinação de tores de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante, propõe o bioensaio a frente *Artemia salina* Leach, pois baseia-se no princípio da letalidade, sendo este um ensaio preliminar acerca da toxicidade dos extratos, com valores de 240 ppm e 220 ppm para os extratos de pimenta Murupi I e II, sucessivamente. Frente esses resultados serem inferiores a 1000 ppm são classificados como tóxicos. Mas, basta lembrar que o emprego de pimentas na dieta está associado a pequenas quantidades, indicando deste modo não serem nocivos ao organismo, muito pelo contrário que esses podem atuar na prevenção de doenças como as cardíacas, diabetes, câncer e até no envelhecimento precoce, uma vez que seu emprego na dieta atua como quimioprevenção diante das espécies reativas de oxigênio.

6. CONCLUSÃO

A metodologia empregada na prospecção fitoquímica das pimentas possibilitou descobrir as possíveis classes presentes nos extratos brutos, indicando os metabólitos especiais presentes nas diferentes pimentas, estabelecendo as distinções entre os morfotipos. Os testes de determinação de fenóis e flavonóides, foram importantes, pois expressaram de modo quantitativo e qualitativo a presença das classes de interesse.

Quanto ao ensaio de atividade antioxidante, mostrou valores satisfatórios de EC_{50} indicando o poder antioxidante das pimentas Murupis. Indicando que os tores de fenóis e de flavonoides estão relacionados com o combate as espécies reativas de oxigênio, bem como seu emprego na dieta acarreta o sequestro destas espécies radiculares.

De modo, geral o extrato da pimenta I apresentou maior relevância na maioria dos testes, porém, mostrou toxidez frente a *A. salina* indicando a importância da continuidade dos estudos fitoquímicos e biológicos, bem como, recomenda-se pequenas quantidades ao incluir na dieta alimentar.

Assim, este trabalho elucidou o perfil químico das pimentas Murupis, do morfotipo Murupi e de Cheiro, contribuindo com o conhecimento teórico acerca de espécies endêmicas e difundidas entre as populações amazônicas, de grande importância

para agricultura familiar e preservação das tradições associadas ao seus respectivos usos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes. 2007. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças**. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dados-do-segmento.php>. Acessado em 16 de fevereiro de 2017.

AMOROZO, M. C.M.; GELY, A.; **Uso de Plantas Medicinais por Caboclos do Baixo Amazonas; Barcarena: PA**; Museu Paraense Emílio Goeldi, 4: p. 47, 1988.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 477, 2008.

BARBOSA, R. I.; LUZ, F.J.; NASCIMENTO FILHO, H.R.; MADURO, C.B.; **Pimentas do Gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. Espécies domesticadas**. *Acta Amazonica*, 32 (2): p. 177-132. 2002.

BARREIROS, ALBS; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos**. *Química Nova*, 29 (1): p. 113-123, 2006.

BIANCHI, M.L.P & ANTUNES, L.M.G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. *Revista de Nutrição*, 12 (2): p. 123-130,1999.

BENTO, C. S.; SUDRE, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; PEREIRA, M. G. **Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotipicamente acessos de pimentas**. *Scientia Agraria*, 8 (2), p. 149-156, 2007.

BRASIL 2006 - Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.

BRASIL 2011 - **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília.

BRASIL 2011 - **Plantas medicinais e fitoterápicos**. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo: São Paulo.

BRASIL 2013 - Resolução CFN nº 525/2013. Regulamenta a prática da fitoterapia pelo nutricionista, atribuindo-lhe competência para, nas modalidades que especifica, prescrever plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos como complemento da prescrição dietética e, dá outras providências.

COSTA, A; PESSANHA, G; CARVALHO, M. G; BRAZ-FILHO, R. **Testes com o Extrato Hidroalcoólico**. *Revista Ceres*, v. XLII, Nº 244, 1995

BRAZ-FILHO, R. **Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente**. *Química. Nova*, 33 (1): p. 229-239, 2010

BRITO, S.C.D. **Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** 96p. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento regional e Agronegócio) Fundação Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2010.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. 1999. **Peppers: vegetable and spice *Capsicums***, New York: *CABI Publishing*, p. 204, 1999.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** *Ciência e Saúde coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/csc/v17n10/17.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

CAMARA, B.; BARDAT, F.; MONEGER, R. **Sites of biosynthesis of carotenoids in *Capsicum*.** *Chromoplasts European Journal of Biochemistry*, 127: p. 255-258, 1982.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil.** Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 27, 2006.

CASALI, V.W.; COUTO, F.A.A. **Origem e botânica de *Capsicum*.** *Informe Agropecuário*, 10 (11): p. 8-10, 1984.

CARLINI, E.A. **Pesquisas com plantas medicinais usadas em medicina popular.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, 29: p. 109-110, 1983.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** *Química Nova*, 21, (1), 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

CHEVALLIER, A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants.** London: *Dorling Kindersley*, 1996.

CEE – Centro de Estudos Etnofarmacológicos. **O que é Etnobotânica.** HEINRICH2004. Disponível em: <http://www.cee.unifesp.br/etnofarmacologia.htm>. Acesso em: 22/12/2016

DOMENICO, C.I.; LILLI, A.J.O.; MELO, A.M.T. **Caracterização de componentes de produção de híbridos intra-específicos de pimenta-hortícola.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 50. Anais... Guarapari: ABH. 2010.

DOMENICO CI; COUTINHO JP; GODOY HT; MELO AMT. **Caracterizaçãoagronômica e pungência em pimenta de cheiro.** *Horticultura Brasileira*, 30 (3): p. 466-472, 2012.

DI STASI, L.C. Arte, ciência e magia. In: - **Plantas Medicinais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. Cap.1, p.15-22, 1996.

DI STASI, L.C. Arte, ciência e magia. In: - **Plantas Medicinais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 323, 1996.

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: ---. **Plantas Mediciniais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. Cap. 9, p.109-128, 1996.

DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica.** 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 604, 2002.

ECHEVERRIGARAY, E. *et al.* Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J;L. (ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap.7, p. 257-278.

EMBRAPA - Embrapa clima temperado. Potato and pepperes earch group. (www.cpact.embrapa.br). Acesso: 18/03/2017.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. Sistema de produção. Pimenta (*Capsicum spp.*). <http://sistemasdeprodução.cnpti.embrapa.br/Fontes:HTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/importanciaeconomica.html>. Acesso: 22/03/2017.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O et al.(ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2001.Cap. 6, p. 91-104. 2001.

FIGUEREDO, C.A.; GURGEL, I.D.G.; GURGEL JUNIOR, G.D. A implantação da Fitoterapia no SUS: uma avaliação à luz do arcabouço normativo. In: OLIVEIRA, M.H.B. et al. (Orgs.). **Direito e saúde: cidadania e ética na construção de sujeitos sanitários.** Maceió: EdUFAL, 2011.

FIGUEREDO, C.A. Fitoterapia (texto didático). João Pessoa: Núcleo de Estudo e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas, 2011.

FIGUEIREDO, C.A; GURGEL, I.G.D.; GURGEL Jr., G.D. **A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios.** *Physis*, 24: p. 381-400, 2014.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. **Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas.** In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Agros, p. 317-334, 2001.

GARCIA, A. A.; CARRIL, P.E. **Metabolismo Secundário de Plantas.** *Reduca*, Universidad Complutense Madrid- Série Fisiologia Vegetal. 2 (3): 119-145,2009.

GOBBO-NETO, L.; e LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30 (2): p. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R. **Evolução química vegetal.** *Ciência e Cultura*, 39: p. 357-360, 1987.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade: Um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, p. 268, 1996.

GOTTLIEB, OR AND BORIN, MRM. **Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity**. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 13 (6): p. 772-776, 2002.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M.A. **Metodologia científica**. São Paulo: Atlas, 2001.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, p. 344p, 2008.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VIEGAS JR, V.F, GRYNBERG, F.N., ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. *Química Nova*, 25 (3): 429-438, 2002.

LIANDA, R. L. P., **Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante**. Tese de Doutorado, PPGQ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,

MARTIN, F.D.; SANTIAGO, J.; COOK, A.A. **The peppers, *Capsicum* species**. *Agricultural Research*, 16: p. 200-218, 1979.

MATOS, FJA. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 150p.

McLEOD, M.J.; GUTTMAN, S.I.; ENSHBAUGH, W.H. **Early evolution of chili peppers (*Capsicum*)**. *Economic Botany*, 36 (4): p. 361-368, 1982.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: Edição Imprensa Universitária/UFV, p. 220, 1995.

MARTINS, G.R.H. **Padronização de medicamentos**. São Paulo. 2011

MELO, R.R.; ARAÚJO, E.R.S.; SILVA, A.A.L.; RANDAU, K.P.; XIMENES, E.C.P.A. 2009 - Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90: p. 298-302.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: Edição Imprensa Universitária/UFV, p 220, 1995.

MARZZOCO, A. e Torres, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.736. 2007.

MONTEIRO, J. M.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. - **Local markets and medicinal plant commerce: a review with emphasis on Brazil**. *Economic Botany*, 64: p. 352-356, 2010.

MOYNA, P & MENÉNDEZ, P. Biotransformação de produtos naturais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, Cap. 5, p. 201-226, 2001.

NEVES, M.C.M. **Plantas medicinais: diagnóstico e gestão**. Série meio ambiente em debate, 35. Brasília: Ed. IBAMA, 2001. 52p.

NUEZ, F.; ORTEGA, R.G.; COSTA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Mundi-Prensa, p.607, 1996.

OCHOA-ALEJO, N.; RAMÍREZ-MALAGÓN, R. **In vitro pepper biotechnology**. In Vitro Cellular Development Biology - *Plant*, 37: p.701-729, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines** – Report of a WHO global survey. Genebra, p. 156, 2005.

PINO, J.; GONZÁLEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURIÓN-YAH, A.R.; TRUJILLOAGUIRRE, J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. **Characterization of total capsaicinoids, color and volatile compounds of habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars in Yucatan**. *Food Chemistry*, 104: p.1682-1686, 2007.

PEREIRA, R. J. e Cardoso, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes**. *Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade*, 3 (4): p. 146-152, 2012

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

RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 200, 2008.

ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTS, G. **Natural products in anticancer therapy**. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4): p. 364-369, 2001.

SANTOS, V.S.F. **Caracterização morfológica e determinação da pungência em pimentos picantes**. 2009. 84f. (Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa).

SANTOS, P.G.; SIANI, A.C. **Consolidação dos grupos de pesquisa em plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil**. *Revista Virtual de Química*, 5: p. 438-449, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 1102, 2007.

SOUSA, J.A.; MIRANDA, E.M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Artigos da Embrapa Acre, Rio Branco, Acre, Brasil. 2003. Disponível em: <<http://www.cpaufac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>>. Acesso em 16 jan. 2017.

- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**; Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda: Nova Odessa, Brazil, 2005.
- SCHNEIDER, C.D. & OLIVEIRA, A.R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de Formação e Adaptação ao Treinamento Físico**. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, 10: p. 308-313, 2004.
- STOESSL, A. **Secondary plant metabolites in plant disease resistance**. Part II: phytoalexins. *Fitopatologia Brasileira*, 11: p. 25-53, 1986.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p 1000, 1996.
- SCHULTES, R. E.; *Journal of Ethnopharmacology*, 11: p.17, 1984.
- SCHULTES, R. E; *Acta Amazonica*, 9: p. 209, 1963.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. 2006 – **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42: p. 289-306, 2006.
- VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; Barreiro, E. J.**Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. *Química Nova*, 29: p. 326-337, 2006.
- WAGNER, H; BLADT, S; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer Verlag, p. 320, 1996.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**. Washington,DC: American Institute for Cancer Research, p. 987, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: WHO, 2002.
- YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. **Capsicum frutescens L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan**. *Economic Botany*, 59 (1): p. 18-28, 2005.