



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

COMUNIDADE EVANGÉLICA LUTERANA "SÃO PAULO"
Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 3.607 - D.O.U. nº 202 de 20/10/2005

Kédma Maria Carneiro

**ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS
EXTRAÍDAS DO FRUTO DA PIMENTA MALAGUETA
(*Capsicum frutescens* L.)**

**Palmas - TO
2014**

Kédma Maria Carneiro

**ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS
EXTRAÍDAS DO FRUTO DA PIMENTA MALAGUETA
(*Capsicum frutescens* L.)**

Monografia apresentada como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Farmácia, coordenado pela Prof^a Mc. Grace Priscila Pelissari Setti, pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientadora: Prof^a Mc. Isis Prado Meirelles de Castro

Palmas -TO

2014

Kédma Maria Carneiro

**ESTABILIDADE E ATIVIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
ANTOCIANINAS EXTRAIDAS DO FRUTO DA PIMENTA MALAGUETA**
(*Capsicum frutiscens* L.)

Monografia apresentada como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Farmácia, coordenado pela Prof^ª Mc. Grace Priscila Pelissari Setti, pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador (a): Prof (a) Mc. Isis Prado Meirelles de Castro

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Mc. Isis Prado Meirelles de Castro
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Mc. Juliane Farinelli Panontin
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Esp. Elisângela Luiza Vieira Lopes Bassani dos Santos
Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2014

RESUMO

CARNEIRO, Kédma Maria. **Estabilidade e atividade antioxidante de antocianinas extraídas do fruto da pimenta malagueta** (*Capsicum frutescens* L.). 2014. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas-TO.

As antocianinas são corantes naturais responsáveis pela coloração vermelha de frutos, flores e vegetais, que desempenham um papel importante na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica, pois os mesmos podem ser utilizados para substituir os corantes artificiais, além disso, podem ser considerados compostos bioativos devido sua atividade antioxidante, o qual permite sua aplicação como conservante de diversos produtos sem amônia e prevenção de doenças crônicas desencadeadas pelo estresse oxidativo. O presente trabalho objetivou extrair antocianinas totais da pimenta malagueta e verificar o potencial antioxidante desses compostos bioativos. Os frutos da pimenta malagueta foram adquiridos na cidade de Palmas-TO, e após o processamento, foram extraídas as antocianinas totais verificando-se a atividade antioxidante e a estabilidade da solução extrativa a partir das metodologias descritas por Fuleki e Francis (1968) e adaptado por Cruz (2008), Rafael et al.,(2008) e Barbacena (2010), respectivamente. O experimento foi realizado em delineamento fatorial (2x2x3), sendo utilizado dois ácidos (cítrico e clorídrico) e quatro diferentes valores de pH. As soluções extrativas acidificadas com etanol/HCl 0,01 M (pH 1,08) e 0,0003 M (pH 2,94) extraiu 291,79 mg/100g e 408,21 mg/100g de antocianinas, respectivamente, enquanto que a primeira solução apresentou a maior atividade antioxidante (75,87%) e a segunda solução apresentou a menor atividade antioxidante (20,23%). Em relação a solução extrativa acidificada com ácido cítrico, pH 1,23 e pH 2,76, a concentração inicial da extração de antocianinas totais foi de 159,43 mg/100g e 160,93 mg/100g, respectivamente e a atividade antioxidante apresentou o percentual de inibição do radical livre (DPPH) de 42,41% e 33,85%, respectivamente, ou seja, apresentou capacidade reduzida em extrair antocianinas e baixa atividade antioxidante comparado com a solução extraída com ácido clorídrico em ambos pHs. Em relação à estabilidade das antocianinas totais em solução pode-se verificar que, independente do ácido e pH utilizados durante a extração, as soluções contendo antocianinas apresentaram o mesmo decaimento, sendo estáveis apenas no tempo 0h após análise, enquanto que o perfil de estabilidade da atividade antioxidante apresentou-se semelhante nas soluções extrativas acidificadas com ácido cítrico (em ambos pHs) e etanol HCl 0,01 M, sendo estável até o tempo de 2h após a análise, porém a solução extrativa acidificada com etanol/HCl 0,0003 M permaneceu estável por menor tempo, 1h após a análise inicial da atividade antioxidante. O resultado da análise de correlação entre as variáveis foi negativo ($r = - 0,2340$), ou seja, os corantes antocianínicos contidos na solução extrativa da pimenta não contribuem integralmente na atividade antioxidante das soluções extrativas analisadas. Sendo assim, verificou-se que o uso das antocianinas totais como corantes de origem natural é limitado devido à baixa estabilidade.

Palavras-chaves: Corantes. Extração. Estabilidade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
3.1 <i>Capsicum frutescens</i> L.	8
3.2 Radicais livres	9
3.3 Antioxidantes	11
3.4 Antioxidantes exógenos	12
3.5 Antocianinas	14
3.6 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante pelo método DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil)	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.2 Amostragem e preparo das amostras.....	18
4.3 Extração e quantificação das antocianinas totais	18
4.4 Análise da atividade antioxidante pelo método DPPH•	19
4.5 Avaliações da estabilidade das soluções extrativas e da atividade antioxidante dos corantes antocianínicos	20
4.7 Análises estatísticas.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* é amplamente cultivado em território nacional, integrando e enriquecendo a biodiversidade e a riqueza cultural brasileira (MOREIRA et al., 2006 apud DAMBROS, 2014; DOMENICO et al., 2012).

As pimentas são consideradas como o segundo tempero mais utilizado no mundo, ficando abaixo apenas do sal de cozinha. Desde o século V a.C, existem registros sobre a utilização da pimenta em forma de condimento e na medicina popular, estando no rol de alimentos considerados funcionais, sendo amplamente comercializado na forma seca, *in natura* e em combinação com agentes aromatizantes (BONTEMPO, 2007; DOMENICO et al., 2012; DAMBROS, 2014).

Esta espécie possui importância social, econômica e medicinal, pois seu cultivo exige a utilização de elevada mão-de-obra, sendo importante produto do agronegócio brasileiro. Em 2004, o volume das exportações de hortaliças brasileiras atingiu 8.479 toneladas, no valor de US\$ 17.344 mil. Em contrapartida, as importações foram de 641 toneladas no valor de US\$ 1.403 mil. As produções de pimenta beneficiaram a balança comercial brasileira com um superávit de US\$ 15.941 mil (EMBRAPA, 2007).

Em relação ao uso medicinal, estudos etnofarmacológicos realizados por Roman et al., (2011), verificaram que o uso popular da pimenta é bastante abrangente, seus frutos são utilizados para o tratamento de diversas doenças, como: “dor de dente”, reumatismo, “amebas” e “vermes” e “ferrada de arraia”.

A pimenta malagueta é um fruto que contém muitas substâncias fisiológicas ativas, como: ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos totais como as antocianinas. Estes compostos podem atribuir benefícios à saúde, pois os mesmos possuem propriedade antioxidante, os quais podem desempenhar um importante papel na neutralização de diferentes espécies de radicais (BONTEMPO, 2007; LAMPE, 1999 apud CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTOS, 2007).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade das antocianinas totais e quantificar a atividade antioxidante, *in vitro*, da solução extrativa do fruto da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), fazendo a correlação entre a concentração do corante antocianínico e a atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o perfil de degradação de antocianinas totais presentes na solução extrativa da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), e verificar a atividade antioxidante desse corante natural.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as antocianinas totais presentes na solução extrativa da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.);
- Avaliar a influência do ácido cítrico e do ácido clorídrico no potencial de extração do corante antociânico presente na pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.);
- Avaliar a estabilidade e a atividade antioxidante do corante antociânico extraído da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), sob refrigeração;
- Verificar os efeitos do período de armazenamento do corante antociânico em função do pH.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Capsicum frutescens* L.

O nome Pimenta vem da forma latina *pigmentum*, passando para o espanhol *pimienta*, apresentando significados de “matéria corante” e depois “especiaria aromática,” respectivamente (BONTEMPO, 2007).

A espécie *Capsicum frutescens* L., popularmente conhecida como pimenta malagueta, malagueta, pimenta caipira e malaguetão, pertence à família das Solanaceas, a mesma do tomate, da berinjela e batata. É uma espécie que possui divergência entre a sua origem, com alguns pesquisadores afirmando que elas surgiram na Amazônia, enquanto que outros afirmam que elas são nativas na América Central (BONTEMPO, 2009; ASSUNÇÃO, 2013).

As pimentas são amplamente cultivadas no Brasil para atender a demanda interna e externa, sendo produzidas como especiarias ou hortaliças, representam um mercado recente e emergente, são comumente utilizadas na culinária, na criação de produtos artesanais, produção de medicamentos, na medicina popular e até mesmo como arma de defesa pessoal, na forma de “spray” de pimenta (RIBEIRO; CARVALHO; RIBEIRO et al., 2008; PAGLIARIN et al., 2012; BRAGA et al., 2013; CAIXETA et al., 2014).

A pimenta malagueta é um arbusto bastante ramificado, é uma planta perene de maturação tardia, que pode medir de 0,9 a 1,2m. O fruto da pimenta malagueta é um bago de estrutura oca, apresenta um formato cônico, ereto e mede até 3,5 cm de comprimento por até 0,5 cm de diâmetro, possui um odor forte e característico, sua coloração varia de acordo com o grau de maturação, apresentando a coloração verde quando imaturo e, durante o processo de maturação, evolui para a coloração vermelha, devido à presença de clorofila e carotenoides, respectivamente. A característica marcante do fruto da pimenta malagueta é a alta concentração do alcaloide capsaína, que confere o sabor pungente nos frutos. (MONTEIRO, 2008; SANTOS, 2009; VALVERDE, 2011).

Referente às propriedades do extrato bruto da pimenta malagueta, foram encontrados na literatura estudos de atividade analgésica (PIRES et al., 2004), antibacteriana contra a *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* (CARVALHO; WIEST; CRUZ, 2010) e antifúngica contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (BUFON et al., 2010).

As diversas atividades biológicas podem ser atribuídas aos metabólitos secundários presentes no extrato vegetal. As antocianinas e carotenoides são metabólitos secundários, frequentemente presentes na pimenta malagueta, sendo apontados como agentes antioxidantes, em virtude de sua natureza química, que possibilita a atuação dos mesmos ao neutralizar ou reduzir os radicais livres (RLs) (DAMBROS, 2014).

3.2 Radicais livres

O processo de formação dos radicais livres, geralmente, inicia-se quando um íon molecular com número ímpar de elétrons gera um fragmento neutro com número ímpar de elétrons que está desemparelhado na última camada eletrônica. Estes fragmentos constituem um radical livre (RL), definido como um átomo ou molécula quimicamente reativa que possui instabilidade energética e cinética e tem como característica o tempo de meia-vida muito curto (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; NELSON; COX, 2011; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ARAÚJO, 2011; COTINGUIBA et al., 2013).

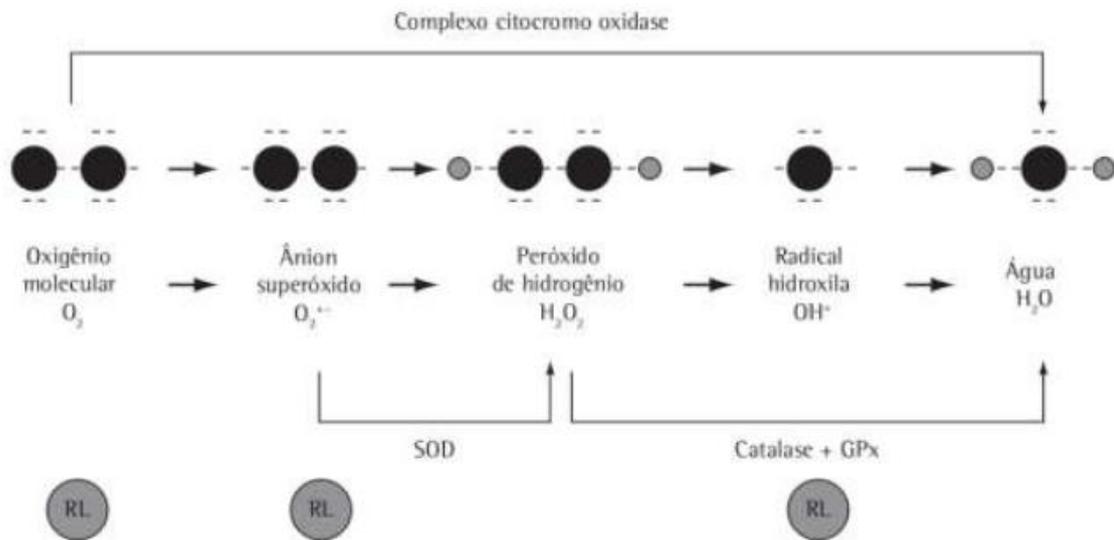
Para que o radical livre seja formado ocorre um processo oxidativo com três etapas simultâneas: iniciação, propagação e término. Na iniciação ocorre a formação de RLs a partir do calor, luz e metais de transição, a propagação envolve a combinação entre o oxigênio molecular e os RL para formar um radical peróxido, no qual remove o H^+ de outra molécula de composto orgânico para formar o hidroperóxido, que é outro RL. A reação é concluída quando o RL é destruído por inibidores ou por reação secundária que eventualmente quebrem a cadeia (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

A formação de RLs pode ser de origem endógena e exógena, sendo comumente denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), quando o elétron do radical livre está localizado nos átomos de oxigênio e nitrogênio, respectivamente (PEREIRA; CARDOSO, 2012; COTINGUIBA et al., 2013).

A principal fonte endógena de radicais livres são os sistemas biológicos, onde estes são formados a partir de reações enzimáticas e/ou não enzimáticas na mitocôndria durante a respiração celular, onde a molécula de oxigênio é reduzida pelo complexo citocromo oxidase

à água (Figura 1). Para que isso ocorra, estão presentes enzimas como NADPH, óxido nítrico sintetase e lipoxigenase, processos que geram como produtos os radicais ânion superóxido, o óxido nítrico e o hidroperóxido de ácidos graxos, respectivamente. Esse processo é importante para que haja a produção de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004; CAVALCANTE; BRUIN, 2009; SOARES et al., 2013).

Figura 1- Redução completa do O_2 e formação dos radicais livres.



RL= Radicais livres; GPx- Glutathione peroxidase.
Fonte: CALVACANTE; BRUIN (2009).

Os fatores exógenos responsáveis pela formação de RL em humanos são: poluentes atmosféricos (ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e fumaça de cigarro), temperatura elevada, ingestão de álcool, exposição à radiação não ionizante UV, dieta inadequada. O excesso dos RL desencadeia efeitos deletérios como o estresse oxidativo, que geralmente está associado ao advento de diversas doenças (CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; CALVACANTE; BRUIN, 2009; VANCINI et al., 2013).

Em um estudo realizado por Andrade e colaboradores (2010) foi indicado que a presença do estresse oxidativo sistêmico em portadoras de infertilidade por endometriose está associado à maior gravidade da doença e, possivelmente, à maior quantidade de focos endometriais ectópicos. Calvacante e Bruin (2009) afirmam que o estresse oxidativo exerce um papel importante na gênese da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) por meio de danos diretos aos componentes do trato respiratório.

Além do que, o estresse oxidativo pode causar danos as biomoléculas (como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) que conseqüentemente está relacionado com as patologias de um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares como predispondo à formação da placa aterosclerótica e câncer (ANTONIADE et al., 2003 apud PINHO et al., 2010 ; SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Devido à produção contínua de radicais livres para manutenção de processos metabólicos, o organismo humano desenvolveu uma série de mecanismos de defesa. A relação de radicais livres com antioxidantes e a preocupação com seus mecanismos de ação se tornou essencial à compreensão de algumas patogenias, em virtude da produção excessiva desses radicais conduzir a danos celulares (PEREIRA; VITAL; CONSTANT, 2009; COTINGUIBA et al., 2013).

3.3 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixa concentração comparada ao substrato oxidável, inibe ou retarda com eficiência o processo de oxidação, sendo encontrados e produzidos por espécie vegetal e/ou pelo organismo humano (COTINGUIBA, et al., 2013). Os antioxidantes endógenos são aqueles produzidos pelo próprio organismo, e podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos antioxidantes endógenos humanos

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes não enzimáticos
superóxidos-dismutases (SOD)	ácido lipóico
catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona-reductase (GSH-Rd)	albumina, ubiquinona, metalotioneínas transferrina, ceruloplasmina

Fonte: PEREIRA; CARDOSO, 2012

As espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas ao organismo humano são produzidas nas mitocôndrias e inativadas por um conjunto de enzimas antioxidantes, entre as quais podem ser citadas as enzimas superóxido dismutase e glutathiona dismutase (NELSON; COX, 2011). Vale ressaltar que a enzima superóxido dismutase é uma das mais importantes

enzimas antioxidantes, sendo encontrada abundantemente nas células aeróbicas (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Durante o processo da fosforilação oxidativa, quando se reduz o oxigênio, ocorre a formação do radical livre superóxido, que é altamente reativo. A enzima superóxido-dismutase na presença de prótons H^+ catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NELSON; COX, 2011).

A glutatona peroxidase é uma enzima presente na mitocôndria e que se constitui na principal defesa contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado na fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2011; SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

A catalase é uma ferrihemoenzima localizada nos peroxissomos que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Esta conversão é dependente da presença de NADPH e, geralmente, esta enzima não está presente na mitocôndria (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Para reduzir o risco do estresse oxidativo, quando o sistema biológico endógeno não consegue neutralizar os radicais livres, percebe-se a necessidade de suplementação de origem exógena de alimentos com compostos bioativos e funcionais com propriedades antioxidantes para atuar de forma cooperativa na proteção de células contra a destruição por radicais livres e, conseqüentemente, a redução de doenças. (CAMPOS et al., 2008; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Por esta razão, têm-se observado a busca pela ingestão de alimentos com propriedade funcional, que são alimentos que além de agregar funções nutricionais básicas produzem efeitos metabólicos e ou fisiológicos que promovem efeitos benéficos à saúde (BRASIL, 1999; ISLAN et al., 2011).

3.4 Antioxidantes exógenos

Cada espécie de planta possui metabólitos secundários específicos que contribuem para sua sobrevivência ao atuar tanto no processo de polinização quanto na proteção contra ataque de herbívoros e outras doenças. As plantas condimentares do gênero *Capsicum* são fontes de compostos fenólicos como flavonoides e carotenoides, considerados como antioxidantes (REIFSCHNEIDER, 2000).

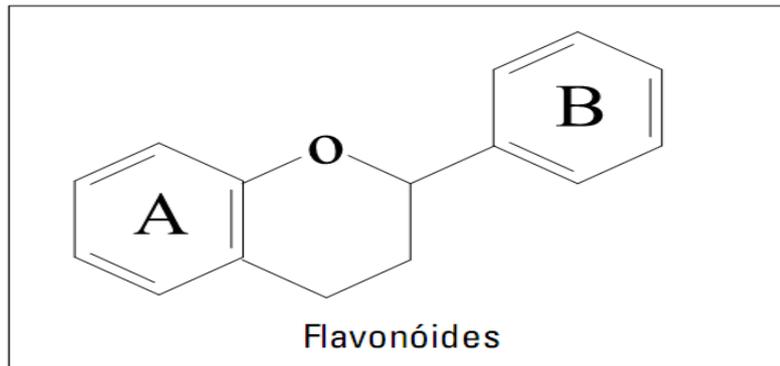
Os terpenoides, como os carotenoides, ao serem suplementados promovem efeitos benéficos sobre os sistemas biológicos, dentre as suas funções o mecanismo mais citado é ação antioxidante, a capacidade de sequestrar radicais livres é devido ao extenso sistema de duplas ligações conjugadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Rios, Antunes e Bianchi (2009) sugeriram que a administração de antioxidantes naturais como os carotenoides presentes na dieta é eficiente na inibição dos efeitos colaterais da cisplatina por serem empregados como inibidores da nefrotoxicidade do antitumoral.

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes exógenos, visto que não são produzidos pelo organismo humano e podem ser suplementados pela alimentação. Estes compostos são advindos de metabólitos secundários originados de espécies vegetais que evitam o estresse oxidativo na planta. Essa propriedade antioxidante é derivada, principalmente, pela sua capacidade redutora, por isso é responsável pela neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; PEREIRA; VIDAL; CONSTANT et al., 2009).

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos, principalmente, em plantas classificadas como angiospermas, apresentando uma enorme diversidade estrutural, sendo considerados como os compostos mais diversificados do reino vegetal (ZUANAZZI; MONTANHA, 2000; BRAZ FILHO, 2013).

Esse metabólito secundário apresenta diversas formas estruturais, mas em sua grande maioria, se caracterizam por possuírem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo esse formado por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio, formando um heterocíclico oxigenado denominado de núcleo flavano. A Figura 2 apresenta a estrutura química dos flavonoides, sendo constituída pelo esqueleto carbônico C6-C3-C6 (anéis A, B e C). Geralmente, os flavonoides estão conjugados com açúcares (heterosídeos) e quando não estiverem conjugados com açúcares são denominados de agliconas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2000; CAMPOS, 2006; CRUZ, 2008).

Figura 2- Estrutura básica dos flavonoides



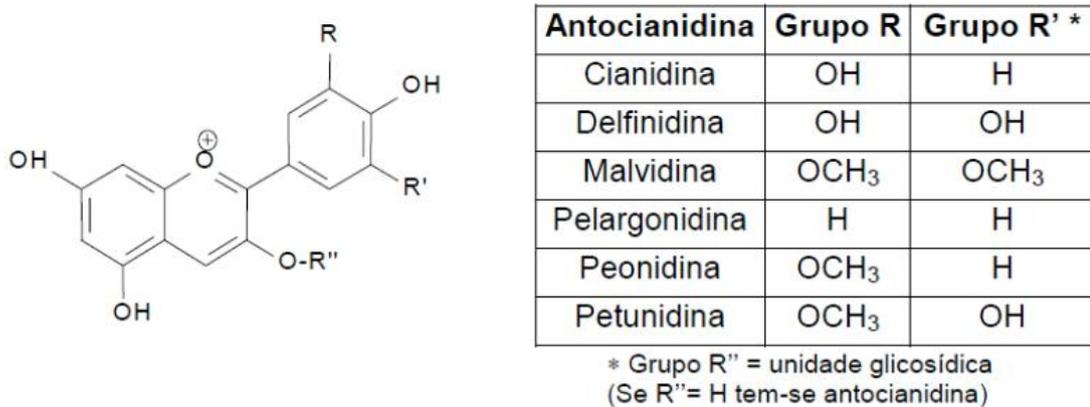
Fonte: MARTINER-FLÓREZ et al., 2002 apud VOLP et al., 2008

Acredita-se que a atividade antioxidante dos flavonoides é proveniente de duas características: a de doar átomos de hidrogênio e, conseqüentemente, reduzir os radicais livres reativos ao complexa-lo com íons metálicos ou metaboliza-los com o peróxido a um radical menos reativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999 apud MATSUMOTO, 2008; CAMPOS et al, 2008). As principais classes de flavonoides encontradas em vegetais utilizados como alimentos são as flavonas, flavanóis e antocianinas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2000).

3.4.1 Antocianinas

As antocianinas são encontradas amplamente nos alimentos de origem vegetal, sendo pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa dos frutos e vegetais. Este corante natural é bioativo por possuir a capacidade antioxidante e também propiciar a fotoproteção e a estabilidade das membranas celulares. Elas podem ser utilizadas em alimentos como aditivos ao substituir corantes sintéticos (PASSOS, 2011; GOUVÊA, et al., 2013).

Quimicamente, as antocianinas são compostos fenólicos caracterizados pela estrutura química C6-C3-C6 (Figura 3). São derivadas da 2-fenilbenzopirilium, ou cátion *flavilium*, que podem ser observadas na região visível do espectro entre 460 e 530 nm.

Figura 3- Estrutura molecular das principais antocianinas

Fonte: CRUZ, 2008.

Como pode ser observado na Figura anterior, há diversos tipos de antocianinas, o que as diferenciam são o número de hidroxila e o grau de metilação, quantidade de açúcares ligados à molécula, bem como ausência destes açúcares (agliconas) (PROVENZI et al., 2006; STRINGHETA; BOBBIO; BOBBIO, 1992).

As antocianinas estão localizadas nas células próximas à superfície das plantas e são facilmente extraídas de materiais vegetais por solventes orgânicos. Tradicionalmente, soluções acidificadas de metanol, etanol, acetona, água e misturas de acetona/metanol/água têm sido usadas para a extração de antocianinas (JU; HOWARD, 2003 apud ROCKENBACH et al., 2008).

Dentre as atividades biológicas das antocianinas pode-se citar o potencial antioxidante. Espín e colaboradores (2000) evidenciaram que o potencial antioxidante de antocianinas pode chegar a ser duas vezes maior que outros antioxidantes disponíveis comercialmente, como a vitamina E, além do que, quando é utilizado, concomitantemente, com outros antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) a atividade antioxidante é potencializada.

As antocianinas são corantes naturais, porém existe uma limitação para serem substituídos por corantes sintéticos, pois à medida que muda o pH da solução, ocorre uma reorganização estrutural da molécula o que possibilita a variação da coloração. Outros fatores podem interferir também na estabilidade, como temperatura, presença de ácidos, de açúcares, de íons metálicos e copigmentos (CRUZ, 2008; STRINGHETA; BOBBIO; BOBBIO, 1992).

No entanto, as indústrias alimentícias e farmacêuticas têm incentivado pesquisas que viabilizem o uso de corantes naturais (por exemplo, antocianinas) (BARCZAK, 2005;

COSTA, 2000 apud MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). A legislação brasileira alimentícia e cosmética não estabelece o limite máximo para utilização do corante natural como coadjuvantes técnicos, sendo que sua concentração pode ser determinada por cada indústria como quantidade suficiente para obter o efeito desejado (BRASIL,1988; BRASIL 2001).

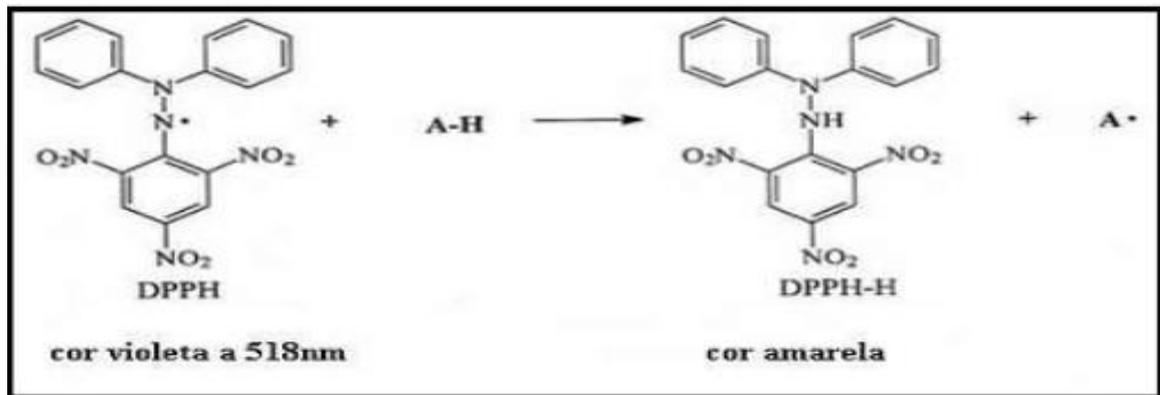
3.6 Avaliações *in vitro* da atividade antioxidante pelo método DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

Existem diversos métodos para quantificar a propriedade antioxidante de compostos presentes em alimentos, como: métodos de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, ABTS, ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), radical ABTS• (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico), radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Os mecanismos dos métodos constituem, geralmente, na habilidade em sequestrar radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, porém, ainda não se definiu um método padronizado, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos em diversos estudos (CAMPOS et al., 2008; SUCUPIRA et al., 2012).

A diversidade de testes com diferentes graus de complexidade sendo que o método DPPH• é o mais utilizado, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade, enquanto que o método captura de radicais livres utiliza-se da técnica analítica de espectrometria de ressonância de spin de elétrons (ESR) é pouco utilizado devido o seu alto custo e baixa sensibilidade para avaliação da atividade antioxidante. A diversidade dos métodos podem ser explicados devido as diferentes formas de constituição, formação e atuação dos radicais livres, por isso as ferramentas metodológicas utilizadas para a avaliação da propriedade antioxidante dificilmente serão padronizadas (CRUZ, 2008; ALVES, et al., 2010; SUCUPIRA, 2012).

O método DPPH• é o mais utilizado para avaliar a atividade antioxidante de frutas. O mecanismo para quantificar esta propriedade não está claramente elucidado, mas sabe-se que na presença de um composto antioxidante, o radical livre DPPH• é reduzido para difenil-picril-hidrazina perdendo a coloração púrpura que muda para amarela (Figura 4), e a atividade antioxidante é determinada pelo decréscimo das absorbâncias, sendo a leitura realizada em 515-520 nm (SOUSA, 2007; RUFINO, 2008; SUCUPIRA, 2012).

Figura 4- Esquema da redução do radical livre estável DPPH• por um antioxidante.



Fonte: RUFINO et al., 2007 apud MANSUR, 2011.

Este é um método simples, preciso e reprodutivo na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais brutos e isolados (ALVES et al., 2010 apud BASTOS, 2012). Para que um método de análise da atividade oxidante, *in vitro*, seja considerado ideal, o mesmo deve ser simples, barato, reprodutível e consiga determinar a quantidade de antioxidante independente da solubilidade e está adaptado para o uso em grande escala além do que ser avaliar o tipo de reação para a redução do radical livre (RUFINO, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 Amostragem e preparo das amostras

Foram utilizadas pimentas malaguetas (*Capsicum frutescens* L), *in natura*, adquiridas na feira do setor Aurenny I, localizada no município de Palmas-TO. Após a aquisição as amostras foram transportadas em sacos plásticos, fornecidos pelos comerciantes, em temperatura ambiente para o laboratório de Pesquisa Científica (CEULP/ULBRA), os frutos foram lavados com solução de etanol 70% e após selecionou-se os frutos maduros de cor vermelha e descartaram-se os frutos verdes e os frutos que continham injúrias mecânicas e infecção por fungos. Os frutos selecionados foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno e, em seguida, armazenados sob refrigeração em aproximadamente -18°C. A amostra representativa foi obtida por quarteamento após um período de 8 dias de armazenamento.

4.3 Extração e quantificação das antocianinas totais

O procedimento foi realizado no laboratório de Farmacognosia (CEULP/ULBRA), onde o teor de antocianinas totais foi determinado pelo método espectrofotométrico, descrito por Fuleki e Francis (1968) e adaptado por CRUZ (2008), considerando a cianidina-3-glicosídeo como antocianina padrão. A quantificação foi feita pela leitura da absorbância em 528 nm. No procedimento experimental, preparou-se uma solução de etanol acidificado com HCL de concentração 0,01 M (pH= 1,08) e iniciou-se o processo da extração das antocianinas totais do fruto da pimenta, pesando-se, separadamente, 5,00 g do material e adicionando-se 50 ml do solvente. Submeteu-se a mistura à agitação por 5 minutos, em agitador magnético. O material foi deixado em repouso, em temperatura ambiente, por 12 horas. Após o repouso, o mesmo foi filtrado em funil de Buchner e transferido para um balão volumétrico de 100 ml. Avolumou-se o filtrado com etanol a 0,001 M, permanecendo em repouso por 60 minutos. Ao final do preparo da solução de análise, realizou-se a leitura em espectrofotômetro em triplicada, e as antocianinas totais foram quantificadas pela Equação 1 desenvolvida por Fuleki & Francis (1968) adaptado por Valadares, Pavlak e Castro (2010). Este mesmo procedimento foi realizado para mais três soluções extrativas utilizando como solvente o

etanol: HCL 0,0003 M (pH= 2,94) e a solução de ácido cítrico com valores de pH de 1,23 e de 2,76, respectivamente.

$$AT = \frac{ABS. PM. FD. V. W. 1000}{\epsilon.b} \quad (1)$$

AT- Antocianinas totais (mg/100g)

ABS = absorvância em 528nm

PM = peso molecular da cianidina-3- glicosídeo (445,2 g/mol)

W = coeficiente da divisão de 100 g da amostra em g.

V=Volume final (L).

ϵ = coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo ($29.600M^{-1}cm^{-1}$)

b= 1 cm (caminho óptico da cubeta)

4.4 Análise da atividade antioxidante pelo método DPPH•

O procedimento foi realizado no laboratório de Pesquisa Científica (CEULP/ULBRA). A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando-se o método do sequestro de radicais livres do DPPH• (2,2-difenil- 1-picrilhidrazila) em espectrofotômetro UV-Vis (Amershan Biosciences/ Ultrospec 500 pro), que consiste em adicionar a um tubo de ensaio 1000 μ l de acetato de sódio 100 mM, 1000 μ l de etanol 96%, 500 μ l da solução de DPPH 0,5 mM e 10 μ l da solução extrativa do fruto da pimenta. Agitou-se a solução resultante por inversão por dez vezes e esta permaneceu em repouso sob proteção da luz, após 10 minutos foram realizadas leituras no comprimento de onda de 517nm. Considerou-se como controle positivo (0% de inibição) a solução de DPPH sem extrato. Para o preparo da linha de base, adicionou-se 1250 μ l de tampão acetato de sódio 100mM e 1250 μ l de etanol 50% v/v. As análises foram feitas em triplicata para a determinação do percentual de redução dos radicais livres e o cálculo foi feito pela equação 2 (DINIS et al., 1994 apud RAFAEL et al., 2007).

$$(\%) = \frac{Ac-At}{2} \times 100 \quad (2)$$

Ac: Absorbância da solução controle;

At: Absorbância da solução teste.

4.5 Avaliações da estabilidade das soluções extrativas e da atividade antioxidante dos corantes antociânicos

O procedimento foi realizado no laboratório de Pesquisa Científica (CEULP/ULBRA). Para avaliar a estabilidade do corante antociânico extraído, quantificou-se a concentração de antocianinas totais, a cada 60 minutos, durante as 7 horas subsequentes a preparação da solução extrativa, adaptando-se a metodologia descrita por Barbacena (2010), onde reduziu-se a quantidade de horas de análise, pois foi observado que as antocianinas degradam-se nas primeiras horas após a extração. Após isso, verificou-se a estabilidade em 24 e 28 horas após o tempo inicial. Ao mesmo tempo em que determinou-se a concentração das antocianinas totais, verificou-se a atividade antioxidante, seguindo a mesma metodologia descrita.

4.7 Análises estatísticas

As médias do percentual da atividade antioxidante e a concentração de antocianinas foram comparadas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA). Foi realizado um esquema fatorial 2 x 2 x 3, constituído por 4 diferentes valores de pH e 2 diferentes ácidos (Ácido Clorídrico e Ácido Cítrico), sendo considerados valores significativos ao nível de 1% de probabilidade, seguindo de comparações múltiplas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

A concentração inicial de antocianinas e a atividade antioxidante do corante antociânico, contido no fruto da pimenta malagueta, foram submetidas à análise de correlação simples entre variáveis. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico ASSISTAT[®] versão 7.7 beta.

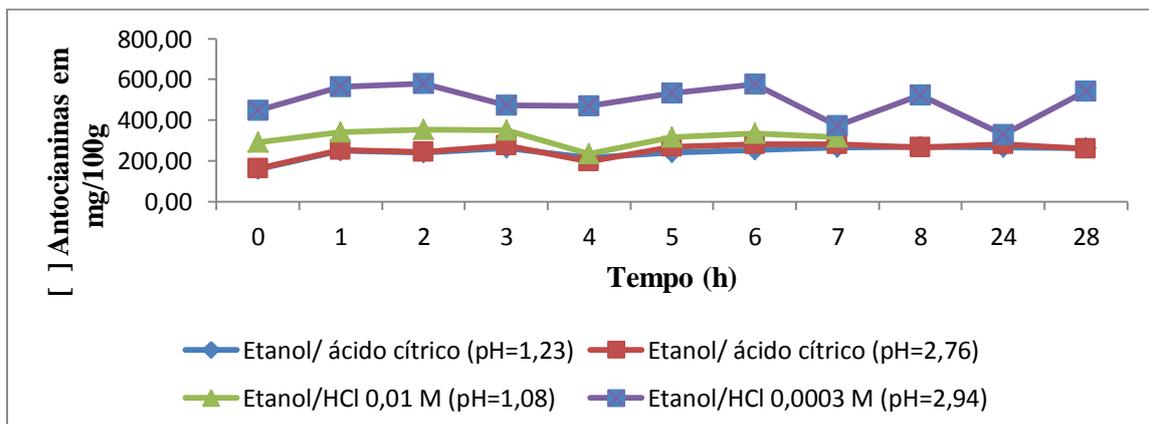
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura do armazenamento é um fator importante na extração de antocianinas, pois estes pigmentos podem sofrer hidrólise nas posições C-3, C-5 e C-7 do núcleo flavílico, sendo que um ou mais hidroxilas estão ligados a açúcares, quando submetidos ao aquecimento, por isso que, durante as etapas de extração e análise de antocianinas presentes na pimenta malagueta, optou-se por manter a solução extrativa sob proteção da luz e refrigerada, a fim de diminuir as alterações oxidativas e, conseqüentemente, a degradação do composto bioativo em estudo (CEICHI, 2003; TERCI, 2004).

A quantificação de extratos contendo antocianinas leva em consideração os valores de absorvidade molar e massa molar referentes à cianidina-3-glicosídeo, e os resultados são expressos em quantidade total de antocianinas em mg/100g do fruto. Utiliza-se a cianidina-3-glicosídeo como um padrão de antocianinas, pois é um corante distribuído na natureza na proporção de 50% em relação às demais antocianinas, sendo amplamente encontrada nos frutos que apresentam coloração avermelhada (TERCI, 2004; ARAÚJO, 2011).

A Figura 5 demonstra os teores de antocianinas totais obtidas da solução extrativa do fruto da pimenta malagueta, expresso em mg/100g do fruto. Observa-se que, quando se utiliza o ácido clorídrico para acidificar o meio, consegue-se extrair mais antocianinas totais do que quando da utilização do ácido cítrico, sendo que inicialmente o etanol/HCl 0,01 M (pH 1,08) e 0,0003 M (pH 2,94) extraiu 291,79 mg/100g e 408,21 mg/100g de antocianinas, respectivamente, enquanto que, quando utilizado como solvente o etanol/ácido cítrico, pH 1,23 e pH 2,76, a concentração inicial foi de 159,43 mg/100g e 160,93 mg/100g, respectivamente.

Figura 5 - Quantificação de antocianinas totais presentes na solução extrativa do fruto da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.)



No tempo inicial (0 h), o extrato contendo antocianinas da pimenta malagueta, em diferentes pHs, apresentaram teores de antocianinas acima que outras polpas de frutas que são conhecidas pela alta quantidade desse corante natural, como a amora, uva, morango, açaí, acerola e goiaba (41,8; 30,9; 23,7; 22,8; 16,0 e 2,7 mg/100g⁻¹, respectivamente), contudo foi inferior que o fruto de baguaçu (596,4mg/100g⁻¹ de antocianinas) (KUSKOSKIET et al., 2006). As antocianinas totais extraídas do fruto da pimenta malagueta, como etanol/ HCl 0,01 M, equivale a concentração de antocianinas totais extraídas da casca de jambolão (216 mg/100g), que teve como solvente extrator o HCl 0,1 % (VEIGAS et al., 2007).

Observou-se, durante as análises, que as antocianinas extraídas da pimenta malagueta apresentaram perfil espectrofotométrico variado em relação a variação de pH e dos ácidos utilizados na extração, apresentando concentrações variadas. Os resultados observados expõem, inicialmente, elevada concentração do composto bioativo em estudo ao ser extraído com o etanol/HCl, possivelmente porque o ácido clorídrico auxilia na extração das antocianinas que estão localizadas próximas a superfície do órgão vegetal, ao permitir que o solvente penetre nos tecidos. Porém, este ácido poderá romper a ligação de antocianinas com metais e co-pigmentos, que auxiliam a estabilidade da molécula, conseqüentemente, pode levar a decomposição deste bioativo (REVILLA et al., 1998; CAMPOS, 2006; MACZ-POP et al., 2006; FAVARO, 2008; JU; HOWARD, 2003 apud ROCKENBANCH, 2008), descrição que pode ser observada no estudo experimental proposto.

Como houve diferença no potencial de extração de antocianinas ao utilizar diferentes ácidos, para reduzir o pH do meio, possivelmente, cada ácido comporta-se de uma maneira quando está em solução, de forma que, podemos afirmar que existe um ácido e um pH ótimo para a extração do ativo em estudo. Percebe-se que tanto o tipo do ácido quanto o pH da solução influenciaram na extração de pigmentos antociânicos.

Quimicamente, os ácidos utilizados são diferentes, sendo HCl um ácido inorgânico forte, enquanto que o ácido cítrico é um ácido orgânico fraco, que em solução apresentam diferentes grau de ionização (VOGEL,1981). O deslocamento do equilíbrio de ionização ácida e a solvatação do ácido em solução interferem no potencial de extração, portanto, o ácido inorgânico usado (maior K_a e maior atividade iônica), aumenta o potencial de extração de antocianinas totais.

A análise de variância para a quantificação do corante, em função do pH da solução de análise e do ácido extrator, está descrita na Tabela 2.

Tabela 2- Análise de variância para a influência do ácido e do pH no potencial de extração de antocianinas da pimenta malagueta

FV	GL	QM	F
Ácido	1	132071.19901	949.3432 **
pH	1	18704.83441	134.4525 **
Ácido X Ph	1	18704.83441	129.3816 **
Tratamento	3	56258.47121	129.3816 **
Resíduo	8	56258.47121	
Total	11		
CV (%)		4,45	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); FV = Fonte de variação; GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F = Estatística do teste F; CV% = Coeficiente de variação em %

De acordo com o teste F, encontram-se diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre os tratamentos com relação ao potencial dos ácidos ao extrair antocianinas da pimenta malagueta. Rejeitamos, portanto, a hipótese de nulidade (H_0), devendo existir pelo menos um contraste significativo entre as médias de tratamento, com relação ao pH e ao ácido utilizado na solução extrativa contendo antocianinas. É significativa a interação entre os fatores em estudo. Tendo em vista o coeficiente de variação obtido neste estudo, inferior a 10%, aceita-se como reprodutível as análises, de acordo com a classificação de Gomes (2000), indicando boa precisão experimental.

Bordignon e colaboradores (2009) evidenciaram que antocianinas presentes no extrato de morango em solução no meio acidificado (pH= 1 e 3) apresentam característica do equilíbrio ácido-base de protonação da estrutura do cátion *flavilium*, conferindo um maior comprimento de onda espectral. Os autores destacaram, também, que o maior teor e a extração mais eficiente de antocianinas ocorre em pH 1, conforme aumentam os valores do pH ocorre a diminuição das ligações duplas conjugadas, os picos máximos de absorção das antocianinas tendem a diminuir e, conseqüentemente, ocorre a perda de coloração.

Para extrair as antocianinas da pimenta, pode-se utilizar tanto o ácido cítrico como o ácido clorídrico, em diferentes proporções, porém, verificou-se que ao utilizar etanol acidificado com ácido cítrico, em ambos os pHs, e ácido clorídrico 0,01 M e 0,0003 M, o produto extraído foi estável em até 1 hora após a extração. Observa-se que, após o período de estabilidade, o aumento na concentração de antocianinas, possivelmente ocorre devido a reações enzimáticas e não enzimáticas que decompõem o pigmento ao possibilitar a oxidação e a formação de outros produtos com o mesmo comprimento de onda da cianidina-3-glicosídeo.

Estes resultados corroboram com estudos de Fonsêca e colaboradores (2012) e Carneiro e colaboradores (2012) que afirmam que a solução extrativa contendo antocianinas extraídas com etanol acidificado (HCl) apresenta baixa estabilidade, sendo estável até 1h após a análise, pois o HCl pode maximizar a instabilização de antocianinas por hidrolisar os açúcares ligados à molécula (HARBONE, 1973 apud OKUMURA; SOARES; CAVALHEIRO, 2002).

Carneiro e colaboradores (2014) sugere que, ao acidificar a solução com o ácido cítrico, aumenta-se a estabilidade da atividade antioxidante das folhas do jambolão, pois, possivelmente, o ácido cítrico age como quelante de metais, inibindo o sítio catalítico da enzima polióxido redutase que, na presença de oxigênio, degrada os compostos fenólicos, justificando o aumento da estabilidade de antocianinas totais extraídas com o ácido cítrico. Contudo, no extrato obtido a partir do fruto da pimenta malagueta, este perfil não foi observado, possivelmente pela diferença entre a matriz em que se encontra o corante e a presença de outras substâncias que podem agir na degradação do corante na solução extrativa. Essas considerações reforçam a dificuldade em se conseguir a estabilidade deste composto, visando sua utilização como conservante de formulações e alimentos frente aos aditivos sintéticos usados atualmente.

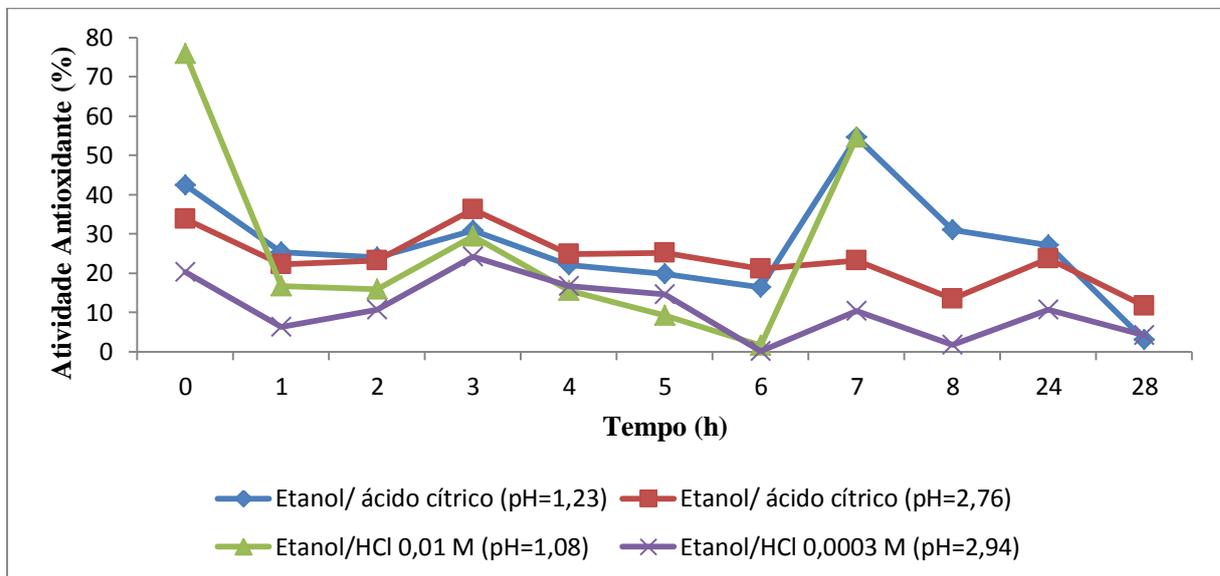
Não foram encontrados na literatura pesquisada neste estudo, trabalhos voltados para a influência do ácido cítrico na extração e estabilidade de antocianinas extraídas do fruto da pimenta malagueta.

Após quantificar e avaliar a estabilidade de antocianinas totais na solução extrativa da pimenta malagueta sentiu-se a necessidade de verificar se o composto em estudo possui atividade antioxidante, *in vitro*, propriedade que possivelmente poderá aumentar a valorização comercial desse corante e, conseqüentemente, sua aplicabilidade na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos.

Na avaliação da atividade antioxidante de solução extrativa contendo antocianinas de pimenta malagueta, evidenciou-se que cada amostra apresentou comportamento distinto no potencial de reduzir o radical DPPH•. Ao analisar os resultados percebeu-se, no tempo 0h, que a solução extrativa acidificada com etanol/HCl 0,01 M apresentou a maior ação antioxidante (75,87%), enquanto que a solução extrativa com etanol/HCl 0,0003M apresentou a menor atividade antioxidante (20,23%), já as soluções extrativas contendo antocianinas extraídas com etanol/ ácido cítrico em pH 1,23 e 2,76 apresentou atividade antioxidante de 42,41% e 33,85%, respectivamente.

Podemos afirmar que o ácido clorídrico 0,01 M é eficiente para extrair compostos bioativos da pimenta malagueta, fato que, conseqüentemente, ocasiona o aumento da atividade antioxidante da solução extrativa no tempo 0h em comparação com as outras soluções em estudo, porém essa atividade antioxidante não é estável, decaindo após o tempo 0h. Os estudos obtidos corroboram com o estudo realizado por Valadares e colaboradores (2012) ao verificar a atividade antioxidante de antocianinas extraídas do fruto do jambolão, em que a solução extrativa acidificada com etanol/HCl (pH=1,0), apresentou a melhor capacidade da atividade antioxidante, cerca de 54,52%.

Figura 6- Estabilidade da atividade antioxidante das antocianinas extraídas da pimenta malagueta



Observa-se, na Figura 6, que cada solução extrativa contendo antocianinas totais extraída com etanol/ ácido cítrico e etanol/ HCl, apresentou decaimento da atividade antioxidante, após o tempo 0h, no período de análise. As soluções extrativas contendo antocianinas acidificadas com etanol/HCl 0,01M e etanol/HCl 0,003M, após 2 horas de análise, apresentam uma redução de 74% e 69,10%, respectivamente, na atividade antioxidante inicial, sugerindo que estes extratos possuem compostos antioxidantes instáveis, que foram rapidamente deteriorados.

Já ao avaliar a atividade antioxidante da solução extrativa contendo ácido cítrico, verificou-se que após 3 horas de análise da atividade antioxidante, as amostras com os pHs 1,23 e 2,76 tiveram redução na atividade de 43,38 % e 33,85%, respectivamente. A solução extrativa contendo ácido cítrico possui menor atividade antioxidante se comparada com a

solução extrativa acidificada com ácido clorídrico, porém, pode-se observar que o decaimento no perfil de degradação é menor.

Destaca-se que as soluções extrativas contendo ácido cítrico, tiveram o período de estabilidade menor do que citam Carneiro e colaboradores (2014), ao verificarem a estabilidade da atividade antioxidante da solução extrativa da folha do jambolão acidificada com o mesmo ácido. Os autores afirmaram que soluções com pH 3 e 4 mantiveram compostos antioxidantes estáveis até 48 h após a extração inicial, mantendo a atividade antioxidante maior que 60% neste período. Da mesma maneira que o ácido cítrico aumentou a estabilidade da solução extrativa contendo antocianinas, como citado anteriormente, possivelmente deve ter mantido as características de outros compostos fenólicos, agindo com sinergismo e conferindo atividade e estabilidade à atividade antioxidante da solução extrativa em estudo. Mais uma vez, verifica-se a influência de vários fatores, como a matriz e a presença de outros compostos, como atuantes na estabilidade e na atividade de antocianinas em solução.

A atividade antioxidante da solução extrativa contendo antocianinas totais variou em função dos diferentes tipos de ácidos e pHs, do qual foi mantido a solução, o resumo do quadro de análise de variância para as variáveis em estudo pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de variância da influência do ácido e do pH na atividade antioxidante do corante antociânico da pimenta malagueta

FV	GL	QM	F
Ácido	1	3079.68480	171.0790 **
pH	1	3079.68480	1807.6804 **
Ácido X pH	1	1635.20053	1807.6804 **
Tratamento	3	1668.78232	1668.78232**
Resíduo	8	1668.78232	
Total	11		
CV (%)		3,03	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); FV = Fonte de variação; GL = Graus de liberdade; QM = Quadrado médio; F = Estatística do teste F; CV% = Coeficiente de variação em %

Os resultados apresentados mostram que, neste experimento, houve diferença estatística ($p < 0,01$) no potencial antioxidante do corante antociânicos pertencente à solução extrativa da pimenta malagueta. O coeficiente de variância foi considerado baixo, indicando boa precisão experimental (GOMES, 2000). Observa-se que existem efeitos significativos na interação entre o pH e o ácido para a atividade antioxidante de pimenta malagueta.

Era esperado que as soluções extrativas com maiores concentrações de antocianinas totais apresentassem maior atividade antioxidante. Porém, o resultado da análise de correlação entre as variáveis foi negativo ($r = - 0,2340$), ou seja, não apresentam correlação, isso indica que os corantes antociânicos contidos na solução extrativa da pimenta não contribuem integralmente na atividade antioxidante, dado que pode ser explicado pela complexidade dos constituintes da solução extrativa, visto que o fruto contém proteínas, vitaminas, minerais que podem atuar como efeito pró-antioxidante e oxidante dos compostos fenólicos, por isso sugere-se mais estudos para determinar a antocianina majoritária da pimenta malagueta e a possível identificação, purificação e quantificação das antocianinas com atividade antioxidante, retirando as substâncias que poderão influenciar de forma negativa nesta atividade.

CONCLUSÃO

Em virtude dos resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que a solução com etanol acidificado com ácido clorídrico 0,003M é mais eficiente para a extração de antocianinas totais e a solução em 0,01M possui, inicialmente, a maior atividade antioxidante (tempo 0h), enquanto que, a solução acidificada com o ácido cítrico, independente do pH, apresenta potencial de extração semelhante, contudo em menor quantidade e com baixa atividade antioxidante. Mesmo assim, observa-se um menor percentual de degradação dos compostos fenólicos na solução acidificada com ácido cítrico, no entanto não foram encontrados trabalhos relacionados com a atividade toxicológica, e por isso, sugere-se que o ácido cítrico seja o melhor ácido para extrair antocianinas totais do fruto da pimenta malagueta.

Com esse estudo, podemos afirmar que é inviável o armazenamento desse corante em solução extrativa acidificada com ácido cítrico e ácido clorídrico, assim, o corante deverá ser incorporado imediatamente após extração. Sugere-se realizar a inativação enzimática e armazenar a solução extrativa a vácuo, com ausência de oxigênio, de forma que reduza a degradação das antocianinas e consiga definir o potencial antioxidante deste composto bioativo, aumentando a aplicabilidade desse corante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRANDRE, A. Z.; RODRIGUES, J. K.; DIB, L. A.; ROMÃO, G. S.; FERRIANI, R. A.; JUNIOR, A. A. J.; NAVARRO, P. A. A. S. Marcadores séricos de estresse oxidativo em mulheres inférteis com endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**. n. 6 v. 32. p. 279-85, 2010.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Ed UFV. Viçosa- MG, 2011.
- ASSUNÇÃO, P. E. V. Dispêndios e viabilidade econômica da produção de pimentas no sul do Goiás. **Revista Política Agrícola**. n. 3.p. 110-118, 2013.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J. M.; DAVID, L. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 10, p 2202-2210, 2010.
- BARBACENA, P. T. **Estudo da estabilidade de antocianinas presentes em extratos de jambolão (*Syzygiumcumini L.*) em função da temperatura de armazenamento**, 32 f, Monografia (Graduação em Farmácia), Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas – TO, 2010.
- BARCZAK, A. B. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – a review. **J. Food Nutr. Sci.** v. 14/55, n. 2, p. 107–116, 2005.
- BRAGA T. R.; PEREIRA, R. C. A.; SILVEIRA, M. R.S.; SILVA, L. R.; SILVA, A; OLIVEIRA, M. M. T. Caracterização físico-química de progênies de pimentas cultivadas em Paraipaba-CE. **Revista ciência plena**. v.9 n. 5., 2013.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007.
- BUFFON, R. B.; SÁ, L. V.; SHALDERS, G.; TAVARES, D. F.; CRUZ, T. P.; RABELLO, L. K C. Efeito de extratos de cravo da índia e pimenta malagueta no controle “in vitro” do *colletotrichum gloeosporioide*. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 2010
- BORDIGNON JUNIOR, C. L.; FRANCESCATTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.1 n. 29 p. 183-188, 2009.
- BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 4, DE 24 de Novembro DE 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000.
- CAIXETA, F.; VON PINHO, E. V. R.; GUIMARÃES, R. M.; PEREIRA, P. H. A. R.; CATÃO, H. C. R. M.; CLEMENTE, A. C. S. Determinação do ponto de colheita na produção de sementes de pimenta malagueta e alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação. **Revista científica**. Jaboticabal, v.42, n.2, p.187-197, 2014.

CAMPOS, D. D. P. **Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão e avaliação dos seus efeitos biológicos (*Syzygium cumini*)** Tese (dissertação Mestre em Química). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2006.

CAMPOS, F. M.; MARTINO, H. S. D. SABARENSE, C.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Revista de Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.

CARNEIRO, K. M. VALADARES.; CASTRO·I.P.M.; PAVLAK·M. C. M.; FARINELLI, J. A influência da temperatura média e do índice pluviométrico na síntese de corantes no fruto acerola (*malpighia glabra* linn.). e análise da estabilidade de xampus corados com antocianinas. **Jornada Acadêmica dos Cursos de Biomedicina e Farmácia do CEULP/ULBRA, 2012.**

CARNEIRO, K. M.; CASTRO·I.P.M.; PAVLAK·M. C. M.; FARINELLI, J. Extração, quantificação, estabilidade de corante natural e adição em xampus a partir do fruto acerola (*Malpighia glabra* Linn.). **Anais XII Jornada de Iniciação Científica do CEULP/ULBRA, Palmas- TO, 2012.**

CARNEIRO, K. M.; CASTRO·I.P.M.; PAVLAK·M. C. M.; FARINELLI, J. Influência do pH de armazenamento sobre a estabilidade da atividade antioxidante do extrato de folhas do jambolão (*syzygium cumini* l.). **Anais XIV Jornada de Iniciação Científica do CEULP/ULBRA, Pasmás- TO, 2014.**

CAVALCANTE, A. G.M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; CRUZ, F.T. Atividade antibacteriana in vitro de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12, n.1, p.8-12, 2010.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. rev. Campinas, SP: Ed. da UNICAMP, 2003.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Revista Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2008.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R S.; ROCHA, J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **Revista Científica Ciências Biológicas de Saúde**. v. 15, n. 3 p.231-7, 2013.

DAMBROS, J. I. **Estabilidade de compostos potencialmente bioativos e alterações de qualidade em frutos e produtos de pimenta (*capsicum* spp.)** Dissertação (Mestrado e ciência e tecnologia de alimentos). Universidade Federal Pelotas, Pelotas, 2014.

DOMENICO, C. I.; COUTINHO, J. P.; HELENA T GODOY, H. T.; MELO A. M. T. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Revista de Horticultura brasileira**. v. 30, n. 3, 2012.

EMBRAPA. Embrapa Hortaliças. Pimenta (*Capsicum* spp.): Coeficientes Técnicos. Versão Eletrônica, 2007.

ESPÍN, J. C. et al. Anthocyanin based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FAVARO, M. M. A. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**. Dissertação (Química analítica) Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

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

FONSECA, H.M.; BASTOS, L. C.; BRITO, E. S.; CASTRO, I. P. M.; MARTA CRISTINA DE MENEZES PAVLAK, M. C. M. Efeito da sazonalidade sobre a concentração e a estabilidade da antocianina do fruto de *Syzygium cumini* L. Skeels coletados em Palmas – TO. **Anais Jornada de Farmácia e Biomedicina**. Palmas-TO, 2012.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

GOMES, P. F. **Curso de estatística experimental**. 14^a ed. Piracicaba – SP: Editora da Universidade de São Paulo, 2000.

GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A. ; OLIVEIRA, L. M.; GODOY, R. L. O; PEIXOTO, F. M; PACHECO, S. ; BORGUINI2, R. G. Fontes naturais de antocianinas para a obtenção de padrões para análise de frutos vermelhos e seus produtos. **Revista Higiene Alimentar**, v.27, n. 218/219, 2013

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Revista Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 23, n.3 p. 418-24, 2004.

ISLAN, S.; NARSIN, S.; KHAM, M. A; HORSAINM A. S.; ISLAN, F.; KHANDOKHAR, P.; MOLHAH, M. N. H. RASHI, M. SODIK, G.; RAHMAM, M. D. A. A.; ALAM, A. K. Evaluation of antioxidant and anticancer operties of the seed extrate of *Syzygium* fruit cosun Roxb. Growing in Rajshah, Bangladesh. **Bio Med Central Complementary and a Alternative medicine**, 2013.

JARDINI, F. A.; LIMA, A.; MENDONÇA, R. M. Z.; PINTO, R. J.; MANCINI, D. A. P.; MANCINI-FILHO, J. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células MDCK. **Revista Alimento e Nutrição**. Araraquara, v. 21, n. 4, p. 509-517, 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Revista Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

MACZ-POP, G. A.; GONZALAO, J. C. R.; ALONSEO, J. P. PARAMÁS, A. G. Natural occurrence of free anthocyanina glycones in beans (*phaseolus vulgaris*L.). **Journal Food Chemistry**, v.94, n.3, p.448, 2006.

MARÇO, P. F.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1218-1223, 2008

MATSUMOTO, R. L. T. **Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguarienses*)**. Dissertação (Mestre em Saúde Pública). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MONTEIRO, E. R. **Identificação botânica e divergência genética em pimentas do gênero *capsicum* spp.** Dissertação (Mestre em Produção Vegetal). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**- 5 ed.-Porto Alegre: Artemed, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OKUMURA, F.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Revista Química Nova**, v. 25, n. 4, p.680-683, 2002.

PAGLIARINI, M. K.; BISCARO, G. A.; GORDIN, C. R. B.; SANTOS, A. M J.; BRANDÃO NETO, J. Níveis de fertirrigação na avaliação das características morfofisiológicas em mudas de pimenta malagueta. **Revista Irrigação**. Botucatu, v. 17, n. 1, p. 46-55, 2012.

PASSOS, A. P. S. **Antocianina obtida de fruto de palmeira juçara (*Euterpe edulis* mart.): estabilização com maltodextrina e aplicação em alimentos**. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2011.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Revista Sociedade Brasileira de Alimentos e nutrição**. São Paulo, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PINHO, R. A.; ARAÚJO, M. C.; GHISI, G. L. M.; BENETTI, M. Doença Arterial Coronariana, Exercício Físico e Estresse Oxidativo. **Revista Brasileira de Cardiologia** v. 4, n. 94, p. 549-555, 2010.

PIRES, P. A.; MALVAR, D. C.; BLANCO, L. C; VIGNOLI, T.; CUNHA, A. F.; VIEIRA, E ; DANTAS, T. N. C.; MACIEL, M. A.M.; CÔRTEZ, W. S.; VANDERLINDE, P. A. Estudo

- das atividades analgésicas do extrato metanólico da *capsicum frutescens* – Solanaceae (pimenta malagueta). **Revista Universidade Rural**. Seropédica, v. 24, n.2, p.129-134, 2004.
- PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT R.; LUIZ, M.T.B. Estabilidade de antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon com β - e γ -ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p. 165-170, 2006.
- RAFAEL, J.A.; JABOR, J.R.; CASAGRANDE R.; GEORGETTI, S.R.; BORIN, M.F.; FONSECA, M.J.V. Validation of HPLC, DPPH• and nitrosation methods for mesalamine determination in pharmaceutical dosage forms. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 1, 2007.
- REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used he extraction of anthocyanins from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, n.11, p.4592, 1998.
- RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO,, S. I.C.; HENZ, G. P.; REFISCHEIDER, F. J. B. **Pimentas capsicum**. EMBRAPA, 2008.
- RIOS, A. O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Revista Alimentos Nutrição**. v.20, n.2, p. 343-350, Araraquara , 2009.
- ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E; KUSKOSKI, E. M. ROSEANE FETT. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28. P. 238-244, 2008.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 2001. 64 p.
- RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Semi- Árido. Mossoró- RN, 2008.
- ROMAN, A. L.C.; MING, L. C.; CARVALHO, I.; SABLAYROLLES, M. G. P. Uso medicinal da pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) em uma comunidade de várzea à margem do rio Amazonas, Santarém, Pará, Brasil. **Revista Ciências Humanas**, Belém, v. 6, n. 3, p. 543-557, 2011.
- SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, 2004.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis. UFRGS, 2000.
- SANTOS, V. S. F. **Caracterização morfológica e determinação da pungência em alimentos picantes**. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrônômica). Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciencia e Cultura**. [online]. vol.66, n.1, p. 38-42, 2014.

STRINGHETA, P. C.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. Stability of anthocyanic pigments from *Panicum melinis*. **Food Chemistry** v. 44 p.37-39, 1992.

SOARES, N. P.; NERES, A. C.; ABREU, T.; PFRIMER, G. A.; NISHIJO, H.; Ferreira, T. A. A. Medicinal plants used by the population of Goianópolis, Goiás State, Brazil. **Revista Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 35, n. 2, p. 263-271, 2013.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; C. AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D; BARROS, E. D.S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

SOUSA, M. M. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do fruto e do licor de jamelão (*syzygium cumini*)** . Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição). Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2012.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Científica de Ciências Biológica da Saúde** . n. 14, v. 4 p.263-9, 2012.

TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 2004. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

VALVERDE, R. M.V. **Composição bromatológica da pimenta malagueta in natura e processada em conserva**. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetenga, 2011.

VALADARES, M. B.; FONSECA, H. M.; PAVLAK, M. C. M., CASTRO, I. P. M. Análise da atividade antioxidante da casca do jabolão (*Syzygium cumini* L. Skeels) coletados em Palmas – TO. **Anais Jornada de Farmácia e Biomedicina**. Palmas-TO, 2012.

VALADARES, M. B.; PAVLAK, M. C. M.; CASTRO, I.P.M. Extração e quantificação de corantes naturais em polpa de acerola (*Malpighia glabra* Linn) de cultivos doméstico na cidade de Palmas - TO. In: **X Jornada de Iniciação Científica do CEULP/ULBRA**. Palmas-TO, 2010.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; JÚNIOR, D. P. G.; SILVA, A. C.; NOUAILHETAS, V. L. A. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, 2013.

VEIGAS, J. M. NARAYAN, M. S. LAXMAN, B.N. NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry** v.105 p. 619–627, 2007.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **IHERINGIA**, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 83-103, 2006.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 5 ed. São Paulo, 1981.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STHINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 02, n. 23, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis. UFRGS, 2000.