

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA DO CAMPUS

COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**LÍLIA DA SILVA RAMOS**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO  
PIMENTÃO ALTERADO PELO USO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA**

IMPERATRIZ - MARANHÃO

2015

**LÍLIA DA SILVA RAMOS**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO  
PIMENTÃO ALTERADO PELO USO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Dr. Alan Bezerra Ribeiro

**IMPERATRIZ - MARANHÃO**

2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Alessandra Saraiva de Sousa**

Bibliotecária CRB 13/505

Ramos, Lília da Silva

Isolamento e identificação de metabólitos secundários do pimentão alterado pelo uso de defensivo agrícola / Lília da Silva Ramos - Imperatriz, 2015.

45f.il.:

Orientadora: Prof. Dr. Alan Bezerra Ribeiro.  
Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Curso de Bacharel em Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia de Imperatriz Maranhão (CCSST) Campus Avançado do Bom Jesus / Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2015.

1. Alimentos orgânicos. 2. Pimentão - metabólitos secundários. 3. Agrotóxico - uso defensivo. I Título.

LÍLIA DA SILVA RAMOS

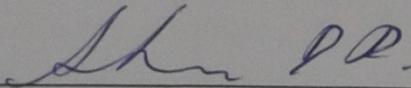
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO  
PIMENTÃO ALTERADO PELO USO DE AGROTÓXICOS

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal do Maranhão –  
UFMA, como requisito para obtenção do  
grau de Bacharel em Engenharia de  
Alimentos.

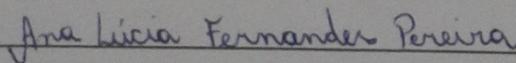
Orientador: Dr Alan Bezerra Ribeiro

Aprovado em 24 de 06 de 2015

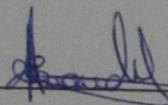
Banca Examinadora



Alan Bezerra Ribeiro



Ana Lúcia Fernandes Pereira



Elizabeth Nunes Fernandes

“Não são nossos talentos que nos mostram aquilo que realmente somos, mas sim nossas escolhas”, (filme *Harry Potter e a Câmara Secreta*).

“Aos meus pais, aos meus irmãos, a minha família, amigos e a Deus, por sempre estar do meu lado, muito obrigada, tentar sempre desistir jamais”.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por sempre está do meu lado, e me proporcionar sabedoria e força pra seguir em frente. Ao meu pai Raimundo Francisco da Silva Ramos e Onezina Alves da Silva Ramos, por sempre me apoiarem no curso, e pelo incentivo e amor que eles me proporcionam sempre.

Ao professor Alan Bezerra por ver meu potencial e ter me feito o convite para participar da iniciação científica, no qual aprendi muito e sofri também muito kkkkkk, foram dias de glórias juntamente com minha fiel escudeira e cúmplice de laboratório Kamila Dias, não deixando de citar também nosso irmão de laboratório Raelson Lima, dias de muito trabalho, risos e aprendizados.

Aos meus irmãos Tiago e Kayo Felipe que mesmo estando longe sempre me deram forças para não desistir e me apoiaram, e também as minhas amigas e maninhas Maressa Carvalho, Raissa Almeida, Samya Augusta que hoje para mim posso considerar minha segunda família, que sempre que precisei estavam ali para me ajudar, nos momentos mais difíceis em que estive em Imperatriz, tanto na alegria, nos risos, e olha que foram muitos, e na tristeza, e ao nosso grupo de amigas (Zamigas).

As minhas outras maninhas Camila Figueira, Rayara Brandão e Paula Fabrycia, que me acompanharam desde sempre, quando ainda nem tinha o sonho de um dia me tornar estudante de Engenharia de Alimentos, e a minha nova maninha do peito Leidiane Dias que também nunca me deixou a peteca cair, e sempre me deu forças pra seguir em frente.

Quero também agradecer a todos os meus professores, que me ajudaram, e dividiram comigo seu conhecimento, não deixando de destacar a professora Ana Lucia Fernandes pelo convite para ser monitora de laboratório, pois ser monitora só me fez gostar cada vez mais de trabalhar no laboratório, e hoje adoro. A professora Lara Seccadio que sempre fez o possível para que os horários das disciplinas fossem possíveis para que a gente que estava pra formar pudesse fazer a sua disciplina, e apesar de tudo adorava ser a assessora pra dar os recados kkkkkkkk.

## RESUMO

O pimentão (*Capsicum spp*) é uma planta pertencente à família das solanáceas, e uma das hortaliças mais consumidas no Brasil, sendo um dos alimentos que apresentou o maior índice de irregularidades para resíduos de agrotóxicos de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O trabalho teve como objetivos avaliar os metabólitos secundários do pimentão levando em consideração a degradação para conservação de compostos com atividade antioxidante, indicado de acordo com o método de desidratação por liofilização e estufa, e métodos de avaliação cromatográficos para extração dos metabólitos secundários do pimentão obtido do cultivo em modo convencional e orgânico, após desidratação os metabólitos dos cultivos diversos do pimentão foram extraídos com os solventes hexano, diclorometano e etanol. Os extratos foram analisados primeiramente por meio da reação de oxidação com luz ultravioleta, por meio do teste com  $\beta$ -caroteno. Com o teste difenil-picril-hidrazila (DPPH), a amostra que apresentou uma maior atividade antioxidante, foi à amostra de pimentão cultivada de modo orgânico. A Cromatografia Líquida em coluna também foi utilizada com o intuito de separar compostos das amostras dos frutos de pimentão convencional e orgânico cultivado em Imperatriz - MA. A partir de frações obtidas na cromatografia em coluna com os extratos de pimentão, foi então avaliado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), método este capaz de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes nas frações de amostra, na qual apresentou sinais em tempo de eluição e intensidades diferentes, aplicando diferentes comprimentos de onda, sendo possível observar que o efeito do uso do agrotóxico age sobre os metabólitos dos pimentões. Por meio do CLAE, foi observada a presença de diferentes compostos nas amostras a presença de substâncias na fração de pimentão convencional nos dois comprimentos de onda estudados pode estar relacionada ao agrotóxico utilizado, o que difere da fração de pimentão orgânico, pois este não recebe a adição de agrotóxico, podendo dessa forma, influenciar o aparecimento ou não de substâncias.

**Palavras- chave:** CLAE, DPPH, Metabólitos Secundários, Pimentão.

## ABSTRACT

Chili (*Capsicum spp*) is a belonging to the family of the Solanaceae plant, and one of the most consumed vegetables in Brazil, one of the foods that presented the highest rate of irregularities for residues of pesticides according to the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The study aimed to evaluate the side chili metabolites taking into account the degradation conservation of compounds with antioxidant activity, indicated according to the dehydration method for freeze drying and oven, and chromatographic evaluation methods for extracting secondary metabolites obtained peppers cultivation in conventional and organic way, after dehydration metabolites of various chili crops were extracted with hexane solvents, dichloromethane and ethanol. The extracts were first analyzed by the oxidation reaction with ultraviolet light, through the test  $\beta$ -carotene. With diphenyl-picryl-hidrazila test (DPPH), the sample had a higher antioxidant activity, was the cultivated chili sample organic way. The liquid chromatography column was also used for the purpose of separating compounds of the sample of the conventional organic and fruits grown in chili Imperatriz - MA. The fractions obtained from the chromatography column with the pepper extract was then evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC) method capable of performing this separation and quantitative analysis of a large amount of compounds present in the sample fractions in which signals presented on elution time and different intensities, by applying different wavelengths, it is possible to note that the effect of pesticide use acts on chilli metabolites. By means of HPLC, it was observed the presence of different compounds in the samples the presence of substances in conventional chili fractions of the two wavelengths studied can be related to pesticide use, which differs from chili organic fraction, because this does not receive addition of pesticides and may thus influence the appearance or not of substances.

**Keywords:** HPLC, DPPH, Secondary Metabolites, Pepper.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Pimentão (<i>Capsicum ssp</i>)</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Uso de agrotóxicos nos alimentos</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Alimentos orgânicos</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Metabólitos secundários</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais utilizados</b>	<b>23</b>
4.1.1	<i>Matéria-prima</i>	23
4.1.2	<i>Teste de umidade</i>	23
4.1.3	<i>b- caroteno</i>	23
4.1.4	<i>DPPH</i>	24
4.1.5	<i>Cromatografia em coluna</i>	24
4.1.6	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	24
<b>4.2</b>	<b>Efeito do método de desidratação sobre os metabólitos secundários e atividade antioxidante do pimentão <i>Capsicum spp</i></b>	<b>24</b>
4.2.1	<i>Material vegetal</i>	24
4.2.1.2	<i>Obtenção dos extratos</i>	24
4.2.1.3	<i>Análises da variação dos metabólitos secundários por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos</i>	25
4.2.1.4	<i>Atividade antioxidante</i>	25
4.2.2	<i>Avaliação as alterações dos metabólitos secundários de amostras do pimentão por método convencional e orgânico</i>	26
4.2.2.1	<i>Coleta do Material Vegetal</i>	26
<b>4.3</b>	<b>Obtenção dos extratos</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Cromatografia em coluna</b>	<b>28</b>

<b>4.6</b>	<b>Teste com difenilpicrilhidrazila (DPPH)</b>	<b>29</b>
<b>4.7</b>	<b>Teste do dragendorff</b>	<b>30</b>
<b>4.8</b>	<b>Teste com o <math>\beta</math>-caroteno</b>	<b>30</b>
<b>4.9</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Efeito dos Métodos de Desidratação por Liofilização e em Estufa com Circulação de Ar, sobre a Degradação dos Constituintes Antioxidantes do Pimentão</b>	<b>32</b>
<i>5.1.1</i>	<i>Cromatografia em camada delgada dos extratos e atividade antioxidante com <math>\beta</math>-caroteno</i>	<i>32</i>
<b>5.4</b>	<b>Teste do dragendorff</b>	<b>36</b>
<b>5.5</b>	<b>Teste da cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)</b>	<b>36</b>
<b>5.6</b>	<b>Cromatografia em coluna</b>	<b>37</b>
<b>5.7</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>42</b>

## LISTA DE GRÁFICO

GRÁFICO 1 - Amostras de extratos etanólicos desidratados em liofilizador (Pimentão L) e em estufa (Pimentão E), referente a atividade antioxidante com o padrão Rutina frente ao radical livre DPPH .....	33
GRÁFICO 2 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos do pimentão convencional e orgânico das amostras frente ao DPPH .....	34

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Pé de pimentão cultivado de modo convencional com uso de agrotóxico ABAMECTIN NORTOX, no Cinturão verde situado na cidade de Imperatriz – MA.....	26
FIGURA 2 – Pé de pimentão cultivado de modo orgânico no Cinturão verde situado na cidade de Imperatriz - MA.....	27
FIGURA 3 – Amostras de pimentão cultivado de modo convencional (a) (ABAMECTIN NORTOX) com uso de agrotóxico e orgânico (b).....	27
FIGURA 4– Coluna de cromatografia líquida clássica fase estacionária e uma fase líquida..	29
FIGURA 5 - Reação em tubo de ensaios com DPPH.....	30
FIGURA 6 - Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Modelo Varian /Analítico / 2 Bomba / 2 Comprimento de onda (UV)). .....	<b>3Erro! Indicador não definido.</b>
FIGURA 7 - Esquema de instrumentação básico do sistema CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência). 1) válvula de injeção de amostra; 2) bomba de alta pressão; 3) fase móvel; 4) coluna cromatográfica; 5) detectores; 6) descarte de solvente.....	32
FIGURA 8 - Placas cromatográficas dos extratos hexânicos obtidos eluídos em hexano:acetato de etila (85:15). (a) e (b) extratos hexânico da estufa e do liofilizador respectivamente, revelado com iodo. (c) e (d) extratos hexânico da estufa e do liofilizador respectivamente, após teste com $\beta$ -caroteno.....	33
FIGURA 9 - Placas cromatográficas dos extratos diclorometânicos obtidos e eluídos em hex:AcOEt (7:3). (a) e (b) extratos diclorometânicos da estufa e do liofilizador respectivamente, revelado com iodo. (c) e (d) extratos diclorometânicos da estufa e do liofilizador respectivamente, após teste com $\beta$ -caroteno.....	34
FIGURA 10 - Separação de composto do pimentão por cromatografia em coluna do extrato orgânico com sílica.....	37
FIGURA 11 – Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão orgânico á 365.....	39
FIGURA 12 - Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão orgânico á 254 nm.....	40

FIGURA 13 - Representação gráfica da curva de calibração da fração 7 do extrato de pimentão convencional á 254 nm.....40

FIGURA 14 - Representação gráfica da curva de calibração da fração 7 do extrato de pimentão convencional á 365 nm.....40

## 1. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum* spp), pertencente à família das solanáceas, é uma cultura de clima tropical. Do ponto de vista econômico, está entre as dez hortaliças mais importantes do mercado brasileiro. Muito utilizado na culinária brasileira no cultivo de molhos e na preparação de saladas, é uma cultura de retorno rápido aos investimentos, visto o curto período para o início da produção, por isto é largamente explorada por pequenos e médios horticultores (MARCUSI, BÔAS, 2003).

Internamente, ele é oco, possui sementes pequenas e achatadas, seu formato pode variar de acordo com as espécies, existindo frutos alongados, arredondados, cônicos ou triangulares. Por observação de determinadas características e usos, são separados e classificados vulgarmente de pimentas e pimentões possuem formatos diferentes, e gosto doce. As pimentas apresentam, em sua maioria, frutos menores que os pimentões, possuem formatos variados e seu paladar predominante pungente (EMBRAPA, 2007).

Por não possuir o alcalóide capscicina, o pimentão não apresenta sabor picante como ocorre em outras espécies do gênero *Capsicum*. Podendo ser consumido na forma imaturo (verdes) ou madura (vermelhos ou amarelos), ou, ainda, ser utilizados na indústria alimentícia ou na produção de pigmentos (corantes), segundo Lima (2007 apud SOUZA; NANNETTI,1998).

De acordo com Fonseca (1986), a pimenta sua pigmentação influencia o sabor e o aroma, sendo que os frutos vermelhos são mais saborosos, porque apresentam 50% mais substância picante, a capsaína.

Os carotenóides são pigmentos encontrados na natureza e trazem benefícios para a saúde por sua atividade antioxidante e anticancerígena. Alguns desses compostos apresentam também atividade pró-vitamina A, afirmam Ribeiro e Nunes (2008 apud BIANCHINI;PENTEADO, 1998).

A abertura do mercado brasileiro para produtos orgânicos é recente. Apoiado pela mídia e com a ampla aceitação pela população a demanda vem mostrando, desde 1990, crescimento de cerca de 10% a 20% ao ano. Há uma expansão da oferta, antes restrita as feiras de produtos orgânicos, com efetivo envolvimento das grandes redes varejistas. O surgimento de associações, cooperativas e empresas distribuidoras de produtos orgânicos,

vem permitindo maior oferta desse tipo de alimento, na maioria das cidades do país, segundo Borguin e Silva (2005 apud ORMOND, J.G.P. *et al.*2002).

De acordo com Assis, Arezzo e De-polli (1995), a diferenciação que é observada no hábito alimentar ocorre mais em função da diferenciação do próprio alimento orgânico com relação ao alimento convencional, sendo a saúde pessoal e da família o principal fator de indução ao consumo, seguido pela qualidade do produto.

As substâncias naturais têm sido empregadas como uma importante alternativa metodológica para o ensino de química, principalmente, aquelas relacionadas ao emprego dos conceitos e técnicas utilizadas na química orgânica, como a cromatografia e extração de óleos essenciais, segundo Fonseca e Gonçalves (2012 apud FREITAS, *et al.* 2012).

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, segundo Pereira e Cardoso (2012 apud MARZZOCO; TORRES, 2007).

Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas Silva, *et al.* (2010 apud NASS,2007).

Carvalho, Wiest e Cruz (2010 apud TAKIKAWA *et al.* 2002) afirmam que

A capsaicina e diversos componentes correlatos são conhecidos como capsaicinóides, sendo produzidos como metabólito secundário pelas pimentas do gênero *Capsicum*, provavelmente como barreiras contra herbívoros, classificando as diferentes espécies quanto aos teores de capsaicina, destacando *C. frutescens* (pimenta malagueta) com 0,89%, *C. baccatum* (pimentadedo-de-moça) com 0,48%, *C. annuum* (pimenta-de-jardim) com 0,20%, *C. baccatum* (pimenta cambuci) e os diferentes pimentões (*C. annuum*) com 0,0% do referido composto. Cruz *et al.* (2003) relacionam a pungência à concentração de capsaicina e à atividade antibacteriana dos extratos destas plantas.

Para análise desses metabolismos secundários se faz necessário técnica apropriada, afim de que cada composto do metabolismo sejam analisado sozinho garantindo um estudo mais profundo e direcionado, com resultados precisos e fidedignos. Entre as técnicas usadas

estão à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que são técnicas muito precisas de separação de substâncias de acordo com COLLINS (apud SERRA, 2013).

A cromatografia é uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas. (RIBEIRO; NUNES, 2008). A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais (COLLINS *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Estudar as alterações, e identificar os metabólitos secundários do Pimentão alterado pelo uso de agrotóxico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar processos de extração dos metabólitos secundários do pimentão levando em consideração a degradação de compostos de acordo com o método de desidratação;
- Desenvolver processos cromatográficos para extração dos metabólitos secundários do pimentão obtido do cultivo em modo convencional e orgânico;
- Avaliar a atividade antioxidante do pimentão convencional e orgânico por meio do teste com  $\beta$ - caroteno e DPPH;
- Verificar a presença ou ausência de alcalóides na matéria-prima vegetal;
- Avaliar por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) as alterações dos metabólitos secundários nas duas amostras de pimentão convencional e orgânico;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Pimentão (*Capsicum ssp*)

O pimentão pertence à família das solanáceas, a mesma da batata, tomate, jiló, berinjela e das pimentas em geral. Oriundo do continente latino-americano, sobretudo do México e da América Central, o fruto tropical se espalhou pelo mundo após a chegada do colonizador europeu. Daqui, foi levado para África, Europa e Ásia por embarcações portuguesas (RESENDE, 2011).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE 2006), dentre as os alimentos pertencentes à família das solanáceas o pimentão perde apenas para o tomate (*Solanum lycopersicon L.*) e a batata inglesa (*Solanum tuberosum L.*) com relação à área cultivada e quantidade produzida no Brasil.

Importante fonte de vitamina C, o pimentão atende às necessidades diárias de até seis pessoas. Algumas variedades superam os teores encontrados em frutas cítricas, como laranja e limão. Mas, quando seco, a vitamina é quase totalmente eliminada, e no cozimento a perda chega a cerca de 60%. O pimentão ainda fornece boas quantidades de cálcio, fósforo e ferro e é dotada de baixa caloria, característica muito procurada pelos consumidores preocupados com o peso (PIMENTÃO, acesso em 27 de fevereiro de 2015).

Seu cultivo pode se dar tanto em campo aberto quanto em estufas, sendo o cultivo em campo aberto responsável pela grande maioria da área ocupada com esse legume no Brasil, enquanto ao cultivo em estufas cabe a produção de frutos a serem comercializados maduros na coloração vermelha, amarela e outras. Entre as principais áreas de cultivos estão os estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e estados do Nordeste. Apesar do destaque dado aos estados citados, o pimentão está presente em todo território nacional (MALDONADO, 2000).

O pimentão e as pimentas doces não possuem sabor picante, devido à ausência do alcalóide capsaicina, sendo estes utilizados como corantes e para consumo in natura. As pimentas, em sua maioria, possuem sabor ardido, característico, devido à presença do alcalóide capsaicina na placenta, nas sementes e, pode ser encontrada em menor grau, no pericarpo do fruto, destacando-se a pimenta-malagueta, pelo elevado teor possui sabor mais pungente, segundo Freire, *et al* (2012 apud REIFSCHNEIDER, 2000).

De acordo com dados do IBGE 2006, dentre as os alimentos pertencentes à família das solanáceas o pimentão perde apenas para o tomate (*Solanum lycopersicon L.*) e a batata inglesa (*Solanum tuberosum L.*) com relação a área cultivada e quantidade produzida.

### **3.2 Uso de agrotóxicos nos alimentos**

De acordo com a Lei nº 7.802, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, o termo agrotóxico e afins é definido como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

A agricultura praticada no Brasil pode ser caracterizada pela dependência da utilização de agrotóxicos. Muitas vezes, os produtores rurais consideram o agrotóxico um insumo necessário à viabilidade dos sistemas agrícolas, sendo a única alternativa viável de produção. No entanto, o atual modelo de agricultura representa um processo de insustentabilidade ambiental, pois resulta em situações de risco ao meio ambiente e à saúde humana (BOHNER *et al.*, 2012).

O risco determinado pelos agrotóxicos ou a probabilidade de um indivíduo adoecer pela ação destes produtos é dado pela exposição que a pessoa tem a eles e a toxicidade dos produtos. Assim se há uma alta exposição, mesmo que o produto tenha baixa toxicidade, o risco é alto, como ao inverso com baixa exposição e alta toxicidade, o risco se mantém alto (TRAPÉ, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013), foi realizada uma análise com 3.293 amostras de treze alimentos monitorados, incluindo arroz, feijão, morango, pimentão, tomate, dentre outros. A escolha dos alimentos baseou-se nos dados de consumo obtidos pelo IBGE, na disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes unidades da federação e no perfil de uso de agrotóxicos nestes alimentos, onde de acordo com a Tabela 1, o pimentão obteve valores acima do permitido pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (BRASIL,2013).

**Tabela 1** - Amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios – 2011. (1) amostras que apresentaram somente IA não autorizados (NA); (2) amostras somente com ingredientes ativos autorizados, mas acima dos limites máximos autorizados (> LMR); (3) amostras com as duas irregularidades (NA e > LMR); (1+2+3) soma de todos os tipos de irregularidades.

Produto	Nº de amostras analisadas	Agrotóxico não autorizado		Acima do limite		Acima do limite e não autorizado		Total de Insatisfatórios	
		(1)		(2)		(3)		(1+2+3)	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Alface	134	55	41%	1	0,7%	2	1,5%	58	43%
Arroz	162	26	16%	0	0,0%	0	0,0%	26	16%
Cenoura	152	102	67%	0	0,0%	0	0,0%	102	67%
Feijão	217	13	6%	0	0,0%	0	0,0%	13	6%
Mamão	191	20	10%	14	7,3%	4	2,1%	38	20%
Pepino	200	71	36%	10	5,0%	7	3,5%	88	44%
<u>Pimentão</u>	213	178	84%	2	0,9%	10	4,7%	190	<u>89%</u>
Tomate	151	14	9%	0	0,0%	4	2,6%	18	12%
Uva	208	41	20%	11	5,3%	4	1,9%	56	27%
Total	1.628	520	32%	38	2,3%	31	1,9%	589	36%

Fonte: IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

(A tabela acima apresenta dados numéricos referente a produtos com limite para o uso de agrotóxicos, referente a análises feitas no ano de 2013).

### 3.3 Alimentos orgânicos

No Brasil a lei Federal n ° 10.831 de 23 de dezembro de 2003, considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possíveis métodos culturais, biológicos e

mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

Nos anos 70, a agricultura orgânica surgiu como uma alternativa ao padrão produtivo vigente na época. No Brasil, a agricultura orgânica começa a se estabelecer a partir do ano de 1976 com manifestos de pesquisadores e que ganhou força durante a década de 80 com o surgimento das Organizações não governamentais (ONG) (CASEMIRO; TREVIZAN, 2009).

Os controles de organismos que podem se tornar pragas ou doenças é gerenciado através de controle ambiental, práticas culturais e, eventualmente em casos de desequilíbrios extremos, utilizam-se pontualmente produtos de baixo impacto toxicológico (EMBRAPA, 2006).

A agricultura orgânica, que não emprega insumos químicos, já é praticada comercialmente em muitos países. Do ponto de vista ambiental, é uma boa alternativa. Porém, os preços de alguns produtos ainda são mais elevados do que os dos alimentos convencionais. A razão é a demanda ser muito maior do que a oferta, e não porque o custo de produção seja maior. Isso faz com que o consumo de alimentos orgânicos seja ainda um privilégio das classes econômicas mais favorecidas (BRASILIA, 2005).

Para a produção orgânica vegetal ou animal, há uma série de normas técnicas exigidas para a obtenção do selo verde ou selo orgânico. A certificação é um processo que atesta a condição de um determinado alimento, ou seja, se é realmente orgânico. O processo possibilita o reconhecimento do alimento como tendo sido obtido por meio de atividades que atenderam as normas estabelecidas para a produção orgânica. Para o mercado interno, as embalagens ou produtos deverão incluir o selo orgânico, enquanto que para o mercado externo deve ser emitido um certificado para cada tipo de modalidade de exportação adotada pelos agentes, segundo Borguini (2002 apud PENTEADO, 2000).

De acordo com Borguini e Torres (2006), alguns pesquisadores mantêm-se atentos para controlar variáveis como localização da propriedade, cultivar e maturação na colheita, como uma maneira de reduzir o número de fatores potenciais que podem afetar o valor nutricional. Os estudos comparando o sistema de produção como um todo têm relativa

vantagem, pois evitam atribuir importância a fatores individuais no valor nutricional dos alimentos. Além disso, é importante que as propriedades venham sendo manejadas orgânica ou convencionalmente por um considerável período de tempo.

### **3.4 Metabólitos secundários**

Os metabólitos secundários, 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 (Pereira; Cardoso 2012 apud BERG e LUBERT, 2008).

Uma grande porcentagem dos princípios ativos das plantas, que está compreendida dentro dos chamados metabólitos primários está universalmente distribuída e participa da atividade celular de todo ser vivo e cumpre funções vitais. São exemplos de metabólitos primários: proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos graxos, fosfolipídios, etc (BESSA *et al.* 2007).

Exemplos de metabólitos secundários são: flavonóides, alcalóides, cumarinas, agliconas, antraquinônicas, triterpenos e/ou esteróides, saponinas, polifenóis e taninos (ALVES, *et al.*, 2009).

Para análise desses metabolismos secundários se faz necessário técnica apropriada, afim de que cada composto do metabolismo sejam analisado sozinho garantindo um estudo mais profundo e direcionado com resultados precisos e fidedignos. Entre as técnicas usadas está a Cromatografia em camada delgada analítica e a Cromatografia líquida de alta eficiência que são técnica precisa quanto aos resultados de separação de substâncias Serra, R. L. (2013 apud COLLINS *et al.*, 2006).

De acordo com dados do IBGE 2006, dentre as os alimentos pertencentes à família das solanáceas o pimentão perde apenas para o tomate (*Solanum lycopersicon L.*) e a batata inglesa (*Solanum tuberosum L.*) com relação a área cultivada e quantidade produzida.

## **4. METODOLOGIA**

Inicialmente a pesquisa foi dividida em duas fases, na qual na primeira parte foram utilizados pimentões obtidos do cultivo convencional, onde foi analisado o efeito dos métodos por desidratação, em estufa a 40° C com circulação de ar e em liofilizador sobre os

metabólitos secundários e sobre a atividade antioxidante frente ao teste qualitativo do  $\beta$ -caroteno dos frutos de *Capsicum spp* (Pimentão) cultivado em Imperatriz – MA. Com base nos resultados obtidos, prosseguiu-se a segunda etapa da pesquisa com a avaliação dos metabólitos secundários de frutos do pimentão de modo convencional e orgânico, utilizando como melhor método a desidratação por liofilização, que foi constatado na primeira fase.

#### **4.1. Materiais utilizados**

##### *4.1.1 Matéria - prima*

Foram utilizados pimentões convencional comprados em uma feira local da cidade de Imperatriz – MA, e de cultivo convencional e orgânico no Cinturão Verde da cidade de Imperatriz – MA, com a colaboração do professor do CESI UEMA Dr. Paulo Catunda e por Rodrigo de Sousa Silva do curso de Agronomia da UEMA - CESI, onde uma parte desse lote foi utilizada o borrifamento com agrotóxico ABAMECTIN NORTOX.

##### *4.1.2 Teste de umidade*

Determinou-se o teor de umidade do pimentão utilizando-se 3 amostras de peso 0,74118 g para o pedaço menor, 1,3470 g para o médio e 2,1478 g para o grande. A balança analítica por infravermelho utilizada para medição das massas tem precisão de 4 casas decimais e erro associado é de  $\pm 0,0001$  g. A porcentagem em massa da umidade foi obtida pelo próprio equipamento tendo como porcentagem 81,955%.

$$\text{PERCENTAGEM EM MASSA DE UMIDADE} = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{úmida}}} \cdot 100 \%$$

##### *4.1.3 $\beta$ -caroteno*

Para a determinação qualitativa da atividade antioxidante, as amostras foram submetidas à borrifação com o  $\beta$ -caroteno, onde as placas amareladas (depois de borrifadas) foram expostas à radiação ultravioleta do sol. Assim, iniciou-se o processo de oxidação pelo oxigênio atmosférico, ocasionando assim uma reação fotoquímica. Retornando a placa de sílica à sua coloração inicial que era branca, exceto na mancha onde existia o composto com potencial antioxidante.

#### 4.1.4 DPPH

O método do sequestro do radical livre estável 2,2 – difenil -1 -picrilhidrazil (DPPH) foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante, nos extratos etanólico, convencional e orgânico, que se baseia na transferência de elétrons, na qual o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Utilizando como solução de um padrão o flavonóide Rutina.

#### 4.1.5 Cromatografia em coluna

Todas as proporções foram reveladas em luz ultravioleta em dois comprimentos de ondas, em 254 nm e 365 nm para observação de substâncias, nas placas de cromatografia em camada delgada (CCDA). Após as placas serem submetidas à luz ultravioleta foram reveladas com iodo.

#### 4.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os metabólitos secundários foram analisados pela cromatografia líquida de alta eficiência, método este que utiliza equipamentos sofisticados para a separação e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes, em vários tipos de componentes de uma amostra pela interação com a fase estacionária e a fase móvel, tendo como liberdade de escolha da fase móvel, da vazão e da temperatura.

### **4.2. Efeito do método de desidratação sobre os metabólitos secundários e atividade antioxidante do pimentão *Capsicum spp***

#### 4.2.1 Material Vegetal

Os pimentões (*Capsicum spp*) verdes foram cultivados por meio de cultura convencional e adquiridos na feira do mercadinho localizada no centro da cidade de Imperatriz- MA.

#### 4.2.1.2 Obtenção dos extratos

As amostras de pimentões foram cortadas em pequenas proporções e pesadas, para assim passarem pelos métodos de desidratação da estufa e liofilizador.

Após a fase de limpeza e pesagem foram distribuídas em bandejas no liofilizador, e na estufa com circulação de ar a 40 °C para suas devidas desidratações. As amostras desidratadas foram trituradas em um liquidificador de alta rotação (marca: BM43, copo 4L)

até a formação de um pó, obtendo-se como massa final 87,50 g de amostra do liofilizador e 24,69 g de amostra da estufa.

Os extratos hexânico, etanólico e diclorometânico do pimentão foram obtidos por extração com solvente utilizando hexano e diclorometano por três dias. Iniciou-se a extração com solvente com o material obtido após desidratação em estufa com solvente hexano por 24 horas. Esse extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sendo repetido por dois dias consecutivos, obtendo-se um extrato do pimentão desidratado em estufa e outro desidratado em liofilizador. Os extratos diclorometânico e etanólico foram obtidos da mesma forma.

#### *4.2.1.3 Análises da variação dos metabólitos secundários por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos*

Os extratos obtidos foram submetidos à análise por meio de cromatografia em camada delgada, onde as amostras obtidas pelos processos de liofilização e estufa foram aplicadas nas placas cromatográficas eluídas em diferentes fases móveis e em seguida reveladas na câmara escura com luz ultravioleta e no iodo sublimado.

#### *4.2.1.4 Atividade antioxidante*

Para a avaliação da atividade antioxidante, foram feitos os mesmos procedimentos de eluição da placa cromatográfica e em seguida, as placas foram borrifadas com solução de  $\beta$  - caroteno (0,02%), que após exposição à radiação ultravioleta do sol, ocorre uma reação fotoquímica e descolore toda a placa evidenciando as substâncias antioxidante com a coloração amarelada própria do  $\beta$  - caroteno.

A avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico foi feita com o teste do DPPH (0,004%), com reações dos extratos com o DPPH por 30 minutos no escuro para evitar a redução do mesmo. Os extratos e padrão (Rutina) foram avaliados em cinco diluições de concentrações de 0,25; 0,125; 0,062; 0,031 e 0,015 mg/mL. Os resultados das atividades antioxidantes foram obtidos pela leitura da absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm.

## *4.2.2 Avaliação as alterações dos metabólitos secundários de amostras do pimentão por método convencional e orgânico*

### *4.2.2.1 Coleta do Material Vegetal*

Os pimentões que foram usados para dar continuidade à pesquisa após resultados da melhor forma de desidratação foram obtidos a partir do cultivo realizado no Cinturão Verde na cidade de Imperatriz – MA. Em relação às recomendações técnicas de cultivo orgânico pode-se dizer que o preparo do solo acontece similar ao cultivo convencional. No entanto, os lotes para plantio convencional (FIGURA 1), foram localizados de forma que não ocorra contaminação pelo uso do borrifamento com o agrotóxico (ABAMECTIN NORTOX) nos lotes de pimentão plantados de modo orgânico (FIGURA 2), que utiliza como adubo material orgânico e inseticida orgânica para evitar a proliferação de pragas, de acordo com as normas estabelecidas para cultivo do Ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA).

**Figura 1** – Pé de pimentão cultivado de modo convencional com uso de agrotóxico ABAMECTIN NORTOX, no Cinturão verde situado na cidade de Imperatriz - MA.

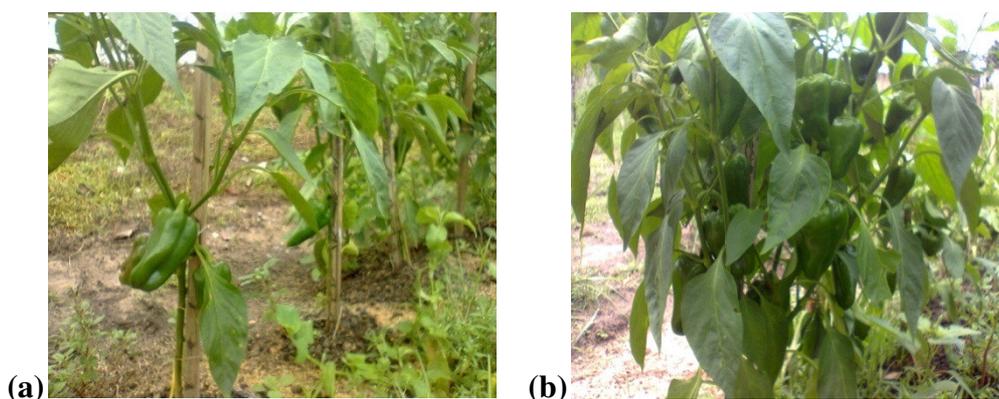


**Figura 2** – Pé de pimentão cultivado de modo orgânico no Cinturão verde situado na cidade de Imperatriz - MA.



Foram coletados os pimentões que apresentaram melhores condições, e que sua coloração apresentava de forma uniforme, e sem estágio de maturação avançado, como pode ser observado na Figura 3. Posteriormente, as amostras desidratadas foram trituradas em liquidificador até a completa formação de um pó.

**Figura 3** – Amostras de pimentão cultivado de modo convencional (a) (ABAMECTIN NORTOX) com uso de agrotóxico e orgânico (b).



### 4.3 Obtenção dos extratos

Após a fase de limpeza e pesagem foram distribuídas os pimentões em bandejas no liofilizador, e na estufa com circulação de ar a 40°C para suas devidas desidratações.

As amostras desidratadas foram trituradas em um liquidificador industrial, obtendo-se como massa final 87,50g de amostra do liofilizador e 24,69g de amostra da estufa. Os extratos das amostras dos pimentões convencionais e orgânicos seu extrato foi obtido pela desidratação ambiente, sendo observado que a estrutura obtida do pimentão é semelhante à desidratada no liofilizador e na estufa.

Os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico do pimentão foram obtidos por extração por solvente com hexano, diclorometano e etanol por três dias. Iniciou-se a percolação com o material obtido após desidratação em estufa com solvente hexano por 24 horas.

Esse extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sendo repetido por dois dias consecutivos, obtendo-se um extrato do pimentão desidratado em estufa e outro desidratado em liofilizador. Os extratos diclorometânicos e etanólico foram obtidos da mesma forma.

A extração dos pimentões de cultivo convencional e orgânico foi obtida por extração por solvente dos demais reagentes utilizados no início da pesquisa, obtendo massa final 74,75g de extrato de pimentão hexânico orgânico, e 108,85g de extrato hexânico convencional, e nos extratos de pimentão etanólico orgânico 79,98g, e 119,77g etanólico convencional, com mudança apenas do modo de desidratação que foi utilizada a temperatura ambiente (25°C).

#### **4.4 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)**

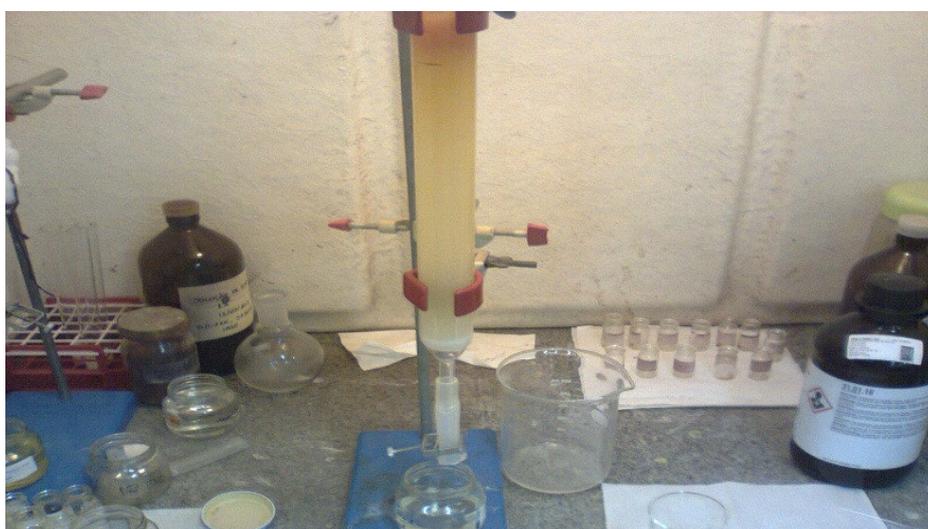
Os extratos obtidos foram submetidos à análise por meio de cromatografia em camada delgada, onde uma pequena quantidade de amostra obtida pelos processos de liofilização e estufa foi aplicada na placa cromatográfica eluída sem diferentes fases móveis e em seguida reveladas na câmara escura com luz ultravioleta e no iodo sublimado.

#### **4.5 Cromatografia em coluna**

Foram adicionados 50 mg de sílica para cromatografia em coluna. Em seguida a coluna foi empacotada juntamente com a sílica e com o reagente hexano, o qual entre outros fatores definiu a eficiência da separação. À coluna foi adicionado uma pequena quantidade de solvente e deposita-se na sua extremidade inferior um chumaço de algodão com espessura de aproximadamente 0,5 cm para impedir a passagem de partículas da fase estacionária. Logo

após o empacotamento (Figura 4), o concentrado extraído do pimentão foi adicionado à coluna, seguido da adição de mais hexano, para obtenção do primeiro constituinte. Após a total coleta do primeiro constituinte, a composição do eluente foi alterada para o segundo constituinte diclorometano, e posteriormente para o terceiro constituinte o álcool. Assim, foi possível visualizar diferentes zonas coloridas descendo pela coluna, que foram então recolhidas, separadamente pela extremidade inferior. Obteve-se 1 mL de cada fração obtida na coluna, com eluente do hexano 1-8, do eluente diclorometano 1-11, e do álcool 1-2.

**Figura 4** – Coluna de cromatografia líquida clássica fase estacionária e uma fase líquida.



#### **4.6 Teste com difenilpicrilhidrazila (DPPH)**

Teste com Difenil-picril-hidrazila (DPPH) foi um dos métodos utilizado para determinar a atividade antioxidante. Foi preparada a solução estoque de DPPH (0,004% em etanol), na qual 4 mg de DPPH foram solubilizados em 100 mL etanol. Para a solução das amostras, pesaram-se 16 mg dos extratos e frações de cada pimentão estudada, que foram misturadas em 4 mL de etanol.

Em tubos contendo 1 mL da solução estoque de DPPH, adicionaram-se etanol e a solução das amostras, obtendo-se as concentrações de 2/ 1 / 0,5 e 0,25 mg/ml de amostra. Na figura 5, é possível observar as amostras contidas nos tubos, onde foram homogeneizadas e deixadas em repouso ao abrigo de luz por 30 minutos.

Após 30 minutos, a absorbância foi lida em 517 nm em espectrofotômetro de UV visível (marca Analyser, modelo LGS), foram utilizadas cubetas de vidro de 1,00 cm de

caminho óptico e foi convertida em percentagem de atividade antioxidante (AA%) utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left[ \frac{(ADPPH' - AExtr)}{ADPPH'} \right] \times 100$$

Onde o ADPPH é a absorbância da solução de DPPH, o AExtr é a absorbância da amostra em solução.

**Figura 5** - Reação em tubo de ensaios com DPPH.



#### **4.7 Teste do dragendorff**

O teste do dragendorff é um reagente de detecção de alcalóides, sendo uma solução de metais pesados, na qual detecta normalmente aminas terciárias e certas aminas secundárias. O reagente também dá provas de alcalóides falso-positivos com proteína devido ao nitrogênio do peptídeo de ligação.

A preparação do revelador dragendorff foi realizada a partir da seguinte fórmula: nitrato de bismuto 1,7 g e ácido tartárico 20 g em água 80 mL (solução A); iodeto de potássio 16 g em 40 mL de água (solução B); misturaram-se partes iguais das soluções A e B (solução estoque); o spray foi preparado dissolvendo-se 10 g de ácido tartárico em água (50 mL) e adicionando-se 10 mL da solução estoque.

#### **4.8 Teste com o $\beta$ -caroteno**

Os extratos foram submetidos à CCDA em diferentes fases móveis para obtenção de um maior número de manchas com Rf's diferentes. Depois de selecionado a melhor fase móvel, submeteu-se as placas ao borrifamento com solução com o  $\beta$ -caroteno (0,02%), teste

este que revela a presença de substâncias antioxidantes após reação de oxidação com luz ultravioleta.

#### **4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Inicialmente foram pesadas 0,5 mg do extrato de modo convencional e orgânico, adicionado 5 mL de metanol para que possa se dissolver, sendo os resíduos separados por filtração. Posteriormente foi usado o ultra – som para tornar a amostra bem solúvel. Logo após, foi feita a injeção individual de cada amostra na coluna cromatográfica, para análise.

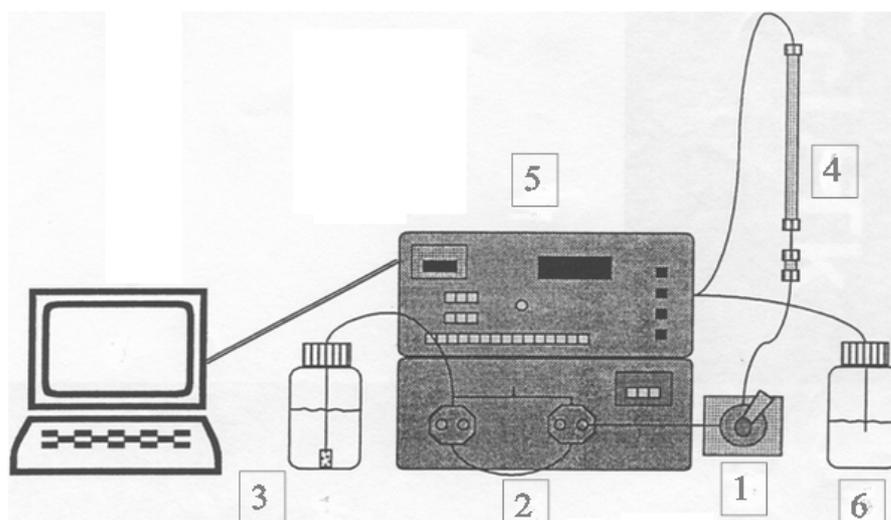
O equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência, Varian (FIGURA 6), munido de bomba de alta pressão, injetor automático com loop, detector de UV-Visível, software Galaxie, coluna de sílica analítica C18, fase móvel composta de metanol (100%); fluxo: 1,0 mL/minuto; tempo de corrida de 70 minutos. Os cromatogramas foram gerados em comprimentos de onda de 254 nm e 365nm. As análises e pós-análises foram controladas por um computador acoplado ao sistema. Na figura 07 pode ser observado um esquema da instrumentação de um cromatógrafo líquido.

**Figura 6** - Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Modelo Varian /Analítico / 2 Bomba / 2 Comprimento de onda (UV)).



Fonte: Foto tirada do Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão em Imperatriz – MA (2015).

**Figura 7** - Esquema de instrumentação básico do sistema CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência). 1) válvula de injeção de amostra; 2) bomba de alta pressão; 3) fase móvel; 4) coluna cromatográfica; 5) detectores; 6) descarte de solvente.



Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/1783449/>>. Acesso em 07/01/2015.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Efeito dos Métodos de Desidratação por Liofilização e em Estufa com Circulação de Ar, sobre a Degradação dos Constituintes Antioxidantes do Pimentão

#### 5.1.1 Cromatografia em camada delgada dos extratos e atividade antioxidante com $\beta$ -caroteno

Os extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada usando-se como fase estacionária a sílica em gel e como fase móvel, solventes orgânicos. Foram utilizados como fases móveis hexano 100%, hexano:acetato de etila (9:1); (8,5:1,5); (7:3) e (1:1), e também acetato de etila 100%.

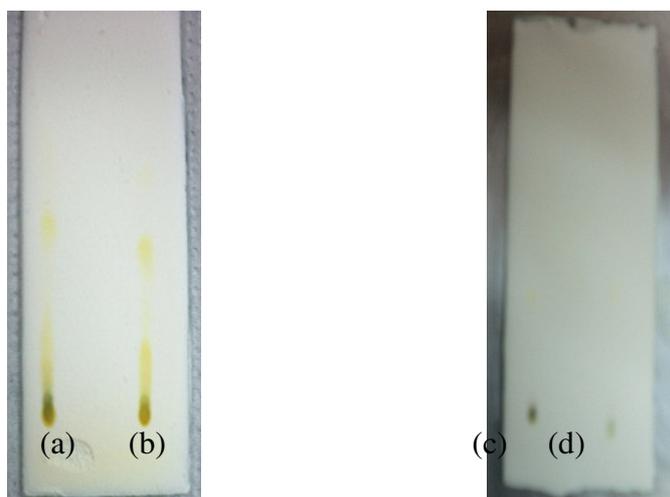
Os extratos hexânicos obtidos eluídos em hexano:acetato de etila (85:15) e diclorometânico eluídos em hex:AcOEt (7:3) obtidos do pimentão desidratado em estufa eliofilizador respectivamente, foram escolhidos por terem tido uma melhor separação em relação as outras fases móveis, e com isso foi realizado o teste de atividade de antioxidante.

Os extratos hexânicos obtidos do pimentão desidratado em liofilizador (a) e em estufa (b) (Figura 8 (a) e (b)) foram submetidos à análise por CCDA e reveladas em luz

ultravioleta em dois comprimentos de onda, em 254 nm e em 365 nm para observação de substâncias que apresentam coloração. Depois de submetidas à luz ultravioleta, as placas foram colocadas para revelar na presença de vapores de iodo, o qual interage com as substâncias presentes na placa, mostrando as em forma de coloração marrom. Não houve uma alteração significativa dos metabólitos.

Em seguida os extratos hexânicos foram borrifadas com solução de  $\beta$ -caroteno onde não apresentou alteração significativa.

**Figura 8** - Placas cromatográficas dos extratos hexânicos obtidos eluídos em hexano:acetato de etila (85:15). (a) e (b) extratos hexânico da estufa e do liofilizador respectivamente, revelado com iodo. (c) e (d) extratos hexânico da estufa e do liofilizador respectivamente, após teste com  $\beta$ -caroteno.



Os resultados mostraram a presença de um maior número de manchas no extrato do pimentão liofilizado em comparação ao obtido em estufa, sugerindo que a desidratação em estufa proporciona uma maior degradação dos metabólitos secundários e consequente perda de substâncias com atividade antioxidante reveladas no teste com o  $\beta$ -caroteno, mostrando que o método de desidratação por liofilização é mais indicado para conservação de compostos com atividade antioxidante.

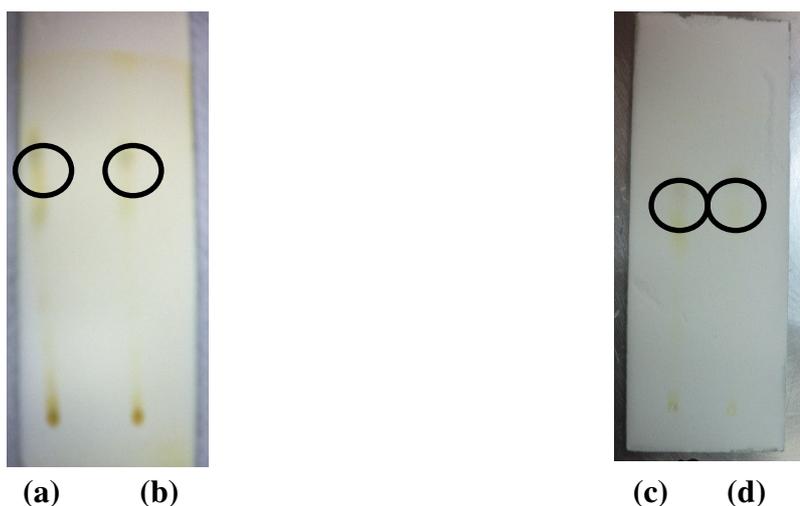
Assim como DIAS (2014), os tomates avaliados utilizando como método de desidratação em estufa e liofilizador, o material desidratado pelo método de liofilização apresentaram substâncias antioxidantes ausentes nos extratos desidratados em estufa. o extrato orgânico apresentou melhores resultados que o extrato convencional.

Analisando a CCDA do extrato diclorometânico do pimentão após revelação no iodo

(Figura 9 (a) e (b)), observou-se manchas marrons com diferentes Rfs quando comparados os dois métodos de desidratação, permitindo afirmar que o extrato obtido do pimentão após desidratação em liofilizador (a) apresentou mais compostos do que o extrato diclorometânico obtido após desidratação em estufa (b), permitindo assim observar alteração dos compostos do tomate após aquecimento.

O extrato diclorometânico do pimentão desidratado em liofilizador (d) após exposição ao sol apresentou pelo menos uma substância com atividade antioxidante significativa frente ao teste com  $\beta$  – caroteno (FIGURA 9 (c) e (d))

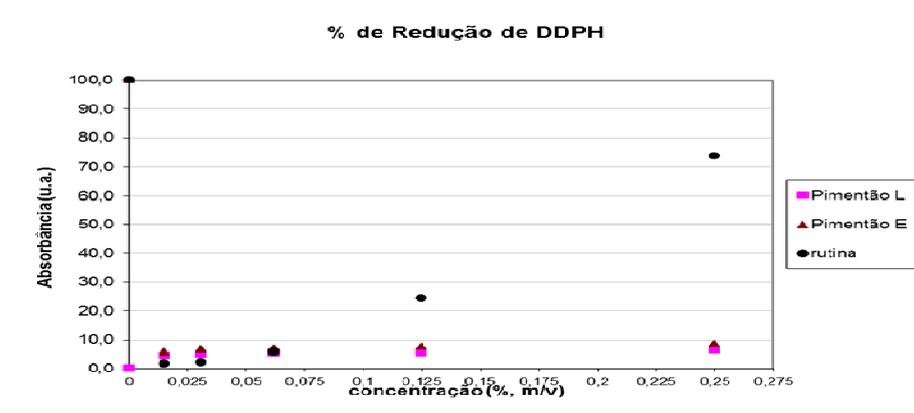
**Figura 9** - Placas cromatográficas dos extratos diclorometânicos obtidos e eluídos em hex:AcOEt (7:3). (a) e (b) extratos diclorometânicos da estufa e do liofilizador respectivamente, revelado com iodo. (c) e (d) extratos diclorometânicos da estufa e do liofilizador respectivamente, após teste com  $\beta$ -caroteno.



O teste de atividade de antioxidante foi realizado utilizando como melhores fases móveis o hexano:acetato de etila (85:15).

No gráfico 1 em relação ao teste de atividade antioxidante apresenta dados obtidos referente ao teste com o DPPH, com os extratos desidratados por estufa e por liofilização usando como padrão o flavonóide Rutina.

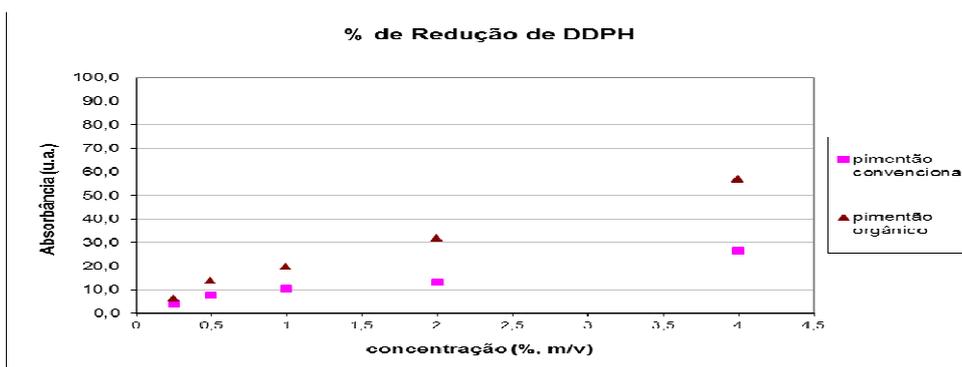
**Gráfico 1-** Amostras de extratos etanólicos desidratados em liofilizador (Pimentão L) e em estufa (Pimentão E), referente a atividade antioxidante com o padrão Rutina frente ao radical livre DPPH.



No gráfico 1, pode-se observar que não houve alteração significativa nos métodos de desidratação frente ao teste do DPPH.

O teste do DPPH no gráfico 2, também foi usado para a atividade sequestradora de radicais livres nos extratos etanólico, convencional e orgânico, sendo observada uma melhor absorbância no pimentão orgânico do que no pimentão convencional. Isso mostra que o pimentão orgânico ocorre uma perda bem menor de compostos antioxidantes.

**Gráfico 2** – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos do pimentão convencional e orgânico das amostras frente ao DPPH



O teste de atividade antioxidante, em DIAS (2014), pelo sequestro do radical DPPH com os extratos etanólicos também evidenciou que o extrato orgânico contém mais atividade antioxidante que o extrato cultivado de modo convencional com uso de agrotóxicos.

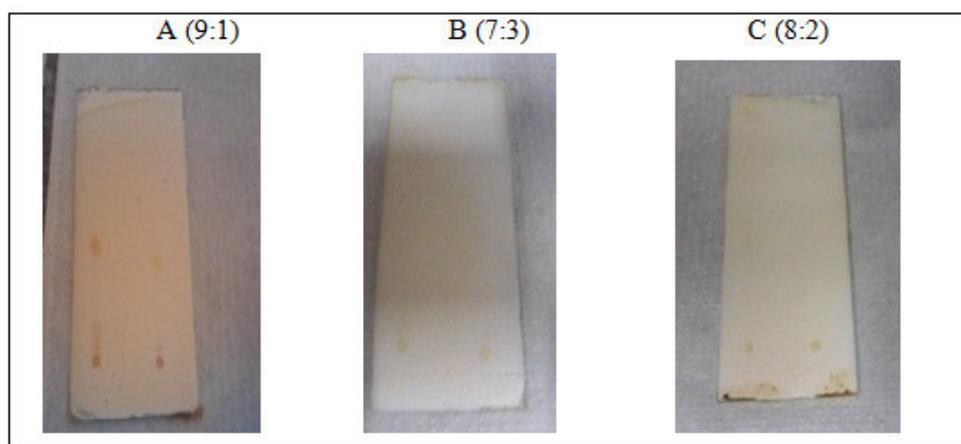
#### 5.4 Teste do dragendorff

Para revelar a presença de possíveis compostos nitrogenados nas amostras de pimentão hexânico convencional e orgânico, foi utilizado o revelador Dragendorff borrifadas nas placas de cromatografia em camada delgada com proporções de 9:1/7:3/1:1, hexano:ETOH (90:10) e hexano: ETOH 99:11, não obtendo nenhuma mancha vermelho – alaranjado característica que o revelador poderia ter apresentado.

#### 5.5 Teste da cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Para avaliar a perda de compostos metabólicos nas amostras de pimentão hexânico convencional e orgânico foi utilizada a cromatografia em camada delgada (CCDA), e revelados em luz ultravioleta em dois comprimentos de onda, em 254nm e em 365nm para observação de substâncias que apresentam coloração<sup>1</sup>. Depois de submetidas à luz ultravioleta, as placas foram colocadas para revelar na presença de vapores de iodo, o qual interage com as substâncias presentes na placa, mostrando as em forma de coloração marrom.

**Tabela 2** - Placas cromatográficas com o extrato hexânico de pimentão (A (hexano:acetato de etila 9:1) / B (hexano:acetato de etila7:3) /C (hexano:acetato de etila8:2))



---

<sup>1</sup> Orgânico no lado esquerdo e convencional no lado direito

No teste das placas (CCDA) referente à Tabela 1, todos os extratos utilizados foram extrato hexânico (orgânico/convencional), na fase móvel 9:1(A) de extrato hexânico, foi observada que tanto na câmara escura, nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, e no iodo o lado que a amostra de pimentão orgânico foi inoculada teve presença de manchas que não foram observadas no lado que estava presente o extrato convencional. Na fase móvel 7:3

(B) não apareceu manchas em nenhum comprimento na câmara escura, mais foi possível observar uma maior presença de manchas no lado orgânico quando em contato com o iodo. Na fase móvel 8:2 (C) não apareceu nenhuma mancha no comprimento de onda 254 nm, porém no comprimento de onda de 365 nm e no iodo, foi observada uma presença maior de manchas reveladas no lado que contem o extrato de pimentão orgânico.

## 5.6 Cromatografia em coluna

As frações obtidas na cromatografia líquida de coluna dos extratos convencional e orgânico do pimentão foram submetidos à cromatografia em camada delgada usados e como fase estacionária a sílica em gel e como fase móvel, solventes orgânicos. Foram utilizados como fases móveis hexano 100%, hexano:acetato de etila (1:1); Acetato (100%); Acetato: Metanol (9:1); e também Metanol (100%).

As frações obtidas na cromatografia de coluna com o extrato hexânico convencional do pimentão (FIGURA 10), obtiveram-se uma banda amarelada. Já na separação dos pigmentos do pimentão, a princípio, com o acréscimo do hexano (eluente apolar) verificou-se o aparecimento de duas bandas uma amarela e outra esverdeada, sendo que esta segunda ao entrar em contato com o diclorometano (eluente de média polaridade) elui, mudando de coloração. Sendo, portanto, necessário uma mudança no eluente utilizado para o etanol (eluente polar).

**Figura 10** - Separação de composto do pimentão por cromatografia em coluna do extrato orgânico com sílica.



Para a escolha dos solventes, optou-se por eluentes que possuíssem produtos comerciais equivalentes, tal como o hexano, diclorometano, e o álcool etílico (álcool comercial). Foram obtidas no total 21 frações, sendo 12 frações de extrato convencional e 9

de frações de extrato orgânico. Após as placas avaliadas dos extratos orgânicos e convencionais as frações foram então juntas com o intuito de diminuir o número de frações a ser estudadas, e selecionando as de melhor resultado. Obtendo-se frações com extrato hexânico convencional do pimentão, com o eluente hexano (1-8), diclorometano (1-11), e o etanol (1-2), e como o extrato orgânico, com o eluente hexano (1-6), e acetato (1-9).

### **5.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

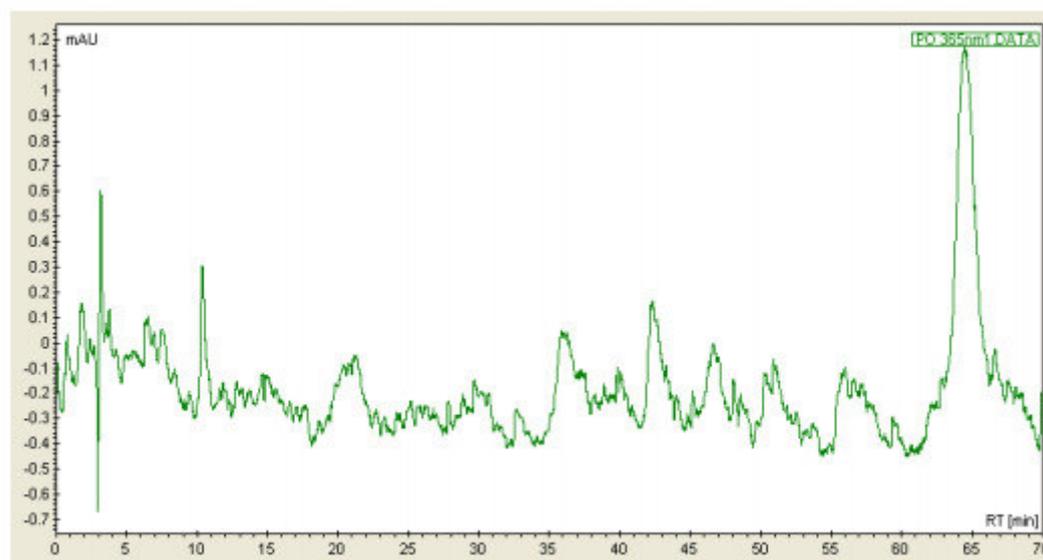
Para o estudo no CLAE, foi realizadas placas de cromatografia em camada delgada com os extratos convencional (5-6/7 hexano 100%), (8-9/11/12 1:1hexano/acetato), obtendo 5 frações, e com os orgânicos (1-4/5-6 hexano100% (7/8/9 9:1 Hexano:ACOET), obtendo 5 frações.

A partir das placas do convencional das frações (5-6/7) a fração 7 obteve melhor resposta, e na orgânica nas frações (7/8/9), a 8 obteve melhor resultado, com isso a fração convencional (7) e orgânica (8) foi novamente feita para comparar na proporção hexano:acetato (1:1).

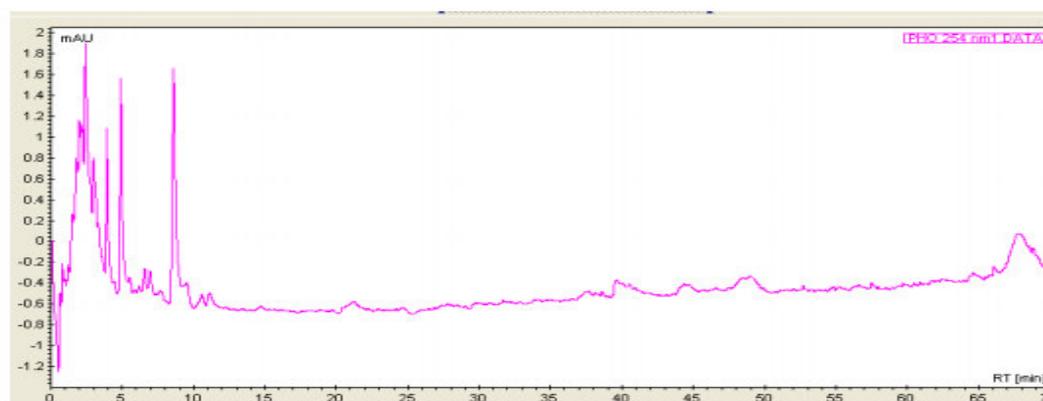
A cromatografia líquida de alta eficiência, utiliza como fase móvel um líquido e equipamento sofisticado para a separação de componentes de uma amostra pela interação com a fase estacionária e a fase móvel, tendo como liberdade de escolha da fase móvel, da vazão e da temperatura. Para a injeção no equipamento foram utilizadas as frações 8 (convencional) e a fração 8 (orgânica), com diferentes comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm respectivamente.

Comparando a Figura 11 com a Figura 12 foi possível analisar, que após correr no intervalo entre 60 e 70 minutos, o pico apresentou maior crescimento no comprimento de onda de 365 nm do que no de 254 nm. Isso pode estar associado ao tipo de agrotóxico utilizado nas amostras estudadas.

**Figura 11** – Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão orgânico á 365

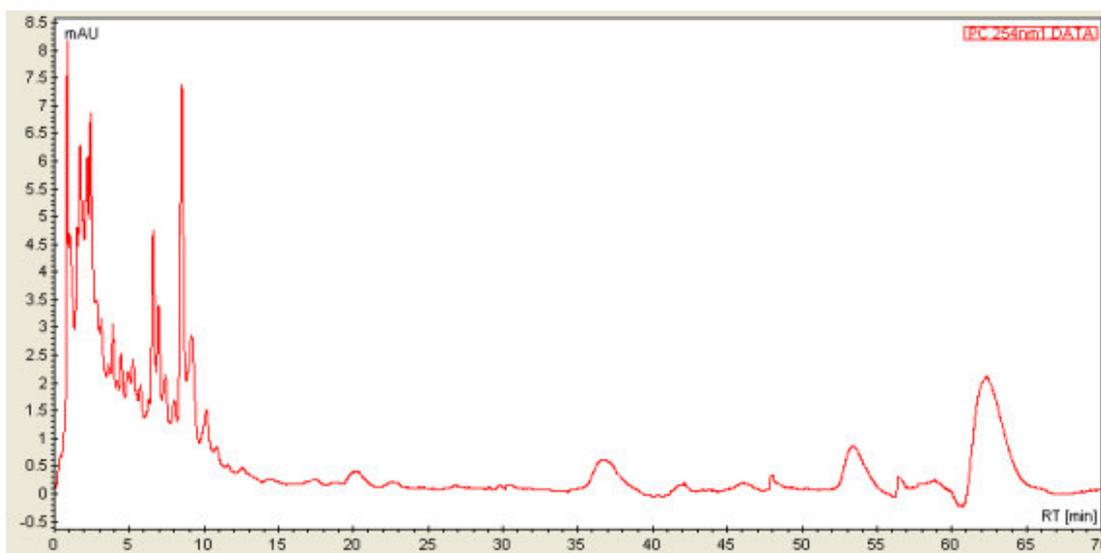


**Figura 12** - Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão orgânico á 254 nm.

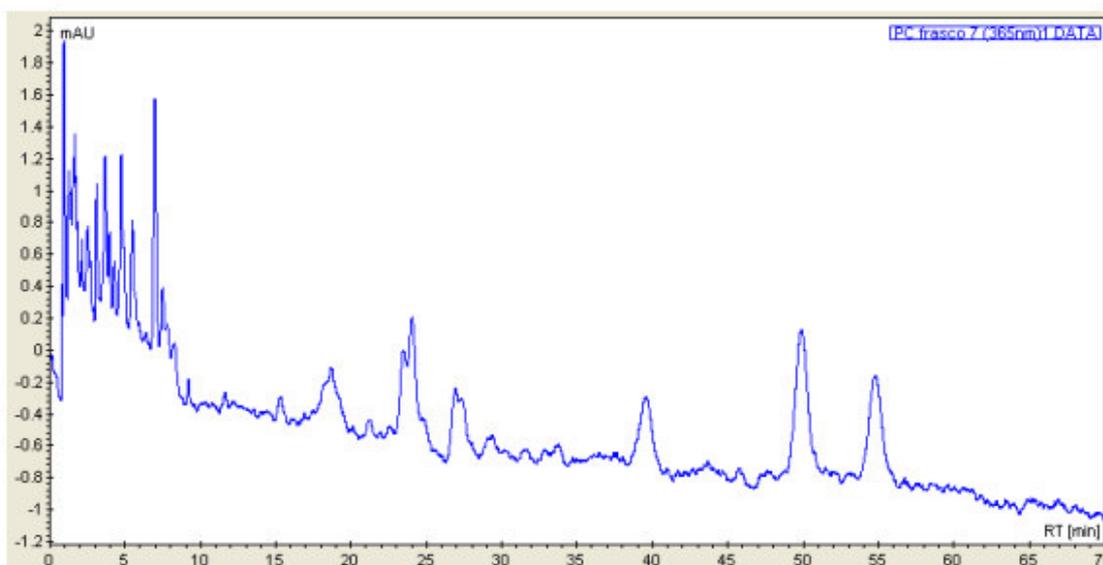


A figura 13 em comparação com a figura 14 apresentou um pico mais definido no intervalo de tempo de 60 a 65 minutos, diferentemente do visualizado na figura 14 no mesmo intervalo. Essa já apresentou picos em intervalo de tempo diferentes, sendo este de 50 a 55 minutos.

**Figura 13** - Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão convencional á 254 nm.



**Figura 14** - Representação gráfica da curva de calibração da fração 8 do extrato de pimentão convencional á 365 nm.



De acordo com as Figuras 11 e 14, foi observado que na fração orgânica (8) pode haver a presença de determinadas substâncias, devido à formação de um pico maior, o que não foi visualizado na fração convencional (8) no comprimento de onda de 365 nm. Já comparando as Figuras 12 e 13, foi observado que a elevação do pico no intervalo de 60 a 65

minutos e a 254 nm pode estar associada ao tipo de agrotóxico utilizado no extrato de pimentão convencional.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a partir dos métodos de desidratação e liofilização usados, foi possível observar que os extratos hexânicos e diclorometânico foram revelados compostos com maior quantidade no pimentão liofilizado em comparação ao da estufa. Recomenda-se o método de desidratação por liofilização.

A alteração dos metabólitos secundários foi observada no teste de atividade antioxidante realizado com o difenil-picril-hidrazila (DPPH), onde o extrato do pimentão cultivado com agrotóxico apresentou diminuição de 50% da atividade em comparação ao pimentão orgânico.

Para avaliar a presença de alcalóides foi utilizado o revelador dragendorff, pois de acordo com a literatura em pimentas do tipo malagueta possui em sua estrutura um alcalóide chamado capsicina, e como o pimentão faz parte do gênero *Capsicum spp*, o agrotóxico poderia ter feito uma mutação na planta, fazendo com que o pimentão passasse a produzir esse alcalóide, ou algum outro, nenhum composto nas placas após serem borrifadas foi apresentado. Isso prova que não se encontra a presença de alcalóides no pimentão, tendo em vista a necessidade de um outro método para avaliar a presença de outras substâncias que possa a vim esta presentes na amostras.

O  $\beta$ -caroteno indicou que há pelo menos uma substância com atividade antioxidante a qual não foi observada no pimentão desidratado em estufa. Nos extratos orgânico e convencional foi observado no teste de cromatografia em camada delgada que aparece mais compostos no extrato orgânico, pois ele tem que produzir mais constituintes para sobreviver, já que no convencional o agrotóxico já faz esse papel, isso pode ser um dos fatores que devem ter levado a perda desses compostos.

A presença de substâncias na fração de pimentão convencional nos dois comprimentos de onda estudados pode estar relacionada ao tipo de agrotóxico utilizado, o que difere da fração de pimentão orgânico, pois este não recebe a adição de agrotóxico, dessa forma o orgânico pode influenciar o aparecimento de novas substâncias. Assim, é possível constatar que o uso de agrotóxico no cultivo do pimentão influenciou de forma significativa na

presença de outras substâncias não observadas no pimentão orgânico, ou seja, substâncias que não são naturais do pimentão.

Com o uso da cromatografia em coluna com as fases moveis de 100% de hexano e 9:1(hexano/acetato), nas amostras dos pimentões convencional e orgânico, foi observado com o auxilio da câmara escura com comprimento de onda de 365nm e 254nm, e o iodo, que o pimentão orgânico e convencional, compostos foram observados em maior quantidade quando revelados no iodo.

Com o uso do CLAE foi observado que a presença de diferentes compostos nas amostras, observadas nos picos mais finos tornando mais eficiente na separação entre duas substancias que eluem próximas, posteriormente deverá ser utilizada diferentes fases móveis para melhor análise dos metabólitos das amostras.

## 7. REFERENCIAS

ALVES et al. 2009. **Congresso Brasileiro de Química**. 49º, 2009, Porto Alegre – RS. Identificação de metabólitos secundários presentes na espécie vegetal *Origanum majorana l* . Porto Alegre, 2009.

ASSIS; AREZZO; DE-POLLI, 1995. Consumo de produtos da agricultura orgânica no estado do Rio de Janeiro. **Revista de Administração**, São Paulo v.30, n.1, p.84-89, janeiro/março 1995.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2013. Website: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30\\_10\\_13\\_1.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 29de janeiro de 2015.

BESSA et al. 2007. Avaliação **fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de Cenchrus echinatus**. *Horizonte Cientifico* 1.1 (2007).

BORGUINI, R.G.; SILVA, M.V. **Características físico-químicas e sensorias do tomate (lycopersicon esculentum) produzido por cultivo orgânico em comparação ao convencional**. Alim. Nutr., Araraquara, v.16, n.4, p. 355-361, out./dez. 2005.

BORGUINI, 2002. **Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) orgânico: o conteúdo nutricional e a opinião do consumidor.** Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

BOHNER et al. 2012. **Reflexões Sobre os Efeitos dos Agrotóxicos no Meio Ambiente e na Saúde Humana: Uma Análise sobre a Conscientização dos Agricultores de Chapecó, SC.** JusBrasil, 2012.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. S., 2006. **Alimentos Orgânicos: Qualidade Nutritiva e Segurança do Alimento.** Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 13(2): 64-75, 2006

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Ministério da Educação. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. **CONSUMO SUSTENTÁVEL: Manual de educação.** Brasília: Consumers International/ MMA/ MEC/IDEC, 2005. 160 p.

CAMPOS et al. 2008. **Rendimento do pimentão submetido ao nitrogênio aplicado via água de irrigação em ambiente protegido.** Revista de biologia e ciências da terra, Volume 8 - Número 2 - 2º Semestre 2008.

CANTUÁRIO, 2012. **Produção de pimentão submetido a estresse hídrico e silicato de potássio em cultivo protegido.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2012.

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

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica. Embrapa hortaliças: versão eletrônica, 2004. Disponível em:<[www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm](http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm)>. Acesso em: 29 janeiro de 2015.

CASEMIRO, A. D.; TREVIZAN, S. D. P, 2009. **Alimentos Orgânicos: desafios para o domínio público de um conceito.** International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo – Brazil – May 20-22-2009.FEIDEN, A.; SILVA, D. J., 2006. Alimentos orgânicos: melhor para vida. ADM - Artigo de Divulgação na Mídia, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, n. 105, p. 1-4, jul. 2006.

CENSO AGROPECUÁRIO 2006. **Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil\\_2006/Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)>. Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de Cromatografia**. Organizadores: Carol H Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. – Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006

CONGIC. IX Congresso de iniciação científica do IFRN, 2012, Rio Grande do Norte. **Avaliação do teor de fenóis e atividade antioxidante de *Capsicum frutescens* L.** Rio Grande do Norte: IFRN, 2012. 8 p.

FREITAS et al. 2012. **Extração e separação cromatográfica de pigmentos de pimentão vermelho: experimento didático com utilização de materiais alternativos**. R. B. E. C. T., vol 5, núm 1, jan./abr. 2012.

LIMA, 2007. **Utilização de efluente de piscicultura na irrigação de pimentão cultivado com fosfato natural e esterco bovino** / Cybelle Barbosa e Lima - Mossoró: 2007.

MALDONADO, 2000. **O cultivo do pimentão**. Revista Cultivar Hortaliças e Frutas, de dezembro/2000-janeiro/2001.

MARCUSSI, Francisco Fernando Noronha; VILLAS-BÔAS, R. L. **Teores de micronutrientes no desenvolvimento da planta de pimentão sob fertirrigação**. *Irriga*, v. 8, n. 2, 2003.

PEREIRA, R. J. e CARDOSO, M. G, 2012. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes**. J. Biotec. Biodivers. v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.

RESENDE, 2011. **Pimentão**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, 2011.

SERRA, 2013. **Análise cromatográfica e avaliação da atividade antioxidante de cultivares de soja transgênica e convencional**. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia de Imperatriz Maranhão (CCSST) / Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2013.

SILVA et al. 2010. Compostos **fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

Sousa AA, Azevedo E, Lima EE, Silva APF. **Alimentos orgânicos e saúde humana: estudo sobre as controvérsias**. Rev Panam Salud Publica. 2012;31(6):513–7.

TRAPÉ, 2003. **Uso de agrotóxicos e a saúde humana**. Workshop tomate na UNICAMP: perspectivas e pesquisas. Campinas, 28 de maio de 2003.