

Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Análise metabolômica não-direcionada de pimentas (*Capsicum* spp.) por
CG-EM**

Bianca Camargo Aranha

Pelotas, 2016.

Bianca Camargo Aranha

**Análise metabolômica não-direcionada de pimentas (*Capsicum* spp.) por
CG-EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Fabio Clasen Chaves

Pelotas, 2016.

Bianca Camargo Aranha

Análise metabolômica não-direcionada de pimentas (*Capsicum* spp.) por CG-EM

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 07 de março de 2016.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves (orientador). Doutor em Biologia Vegetal pela Rutgers, The State University of New Jersey

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dr. Claudio Martim Pereira de Pereira Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof. Dr^a. Joseana Severo Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr^a. Rosa Lía Barbieri. Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho a minha família.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves, por todo ensinamento e contribuição para meu crescimento profissional, sem ele não seria possível essa formação.

Aos meus pais, Marlene e Rafael, pelo apoio e amor incondicional.

A minha Vó Elza, pela agradável companhia e amor de mãe.

Aos meus amados irmãos e cunhada, pelo incentivo e fraternidade.

Ao meu grande amigo e namorado, por toda dedicação, motivação e compreensão nessa jornada.

Aos meus queridos amigos Simone, Claudio, Camila, Júlia, Mauricio e Rosane, pois a vida seria muito dura sem eles.

As minhas adoráveis colegas de trabalho Roseane, Jéssica, Rosane e Francine que muito contribuíram nos momentos de dificuldades.

Aos meus professores da graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos em especial as professoras Angelita, Graciela e Paula, pois foram a base para esta formação.

Aos professores do Departamento, em especial ao Prof. Nathan pela contribuição, ensinamentos e paciência.

A todos do Departamento, que de alguma maneira contribuíram para meu bem estar e conclusão desta formação, e foram muitos.

Ao departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial e a Universidade Federal de Pelotas (UFPel), pelo espaço e equipamentos cedidos.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo fornecimento da bolsa.

A Secretaria de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul através do programa de apoio aos polos tecnológicos pelo apoio com recursos às pesquisas.

A Banca examinadora, pelas correções, sugestões e troca de conhecimentos.

A Deus pela oportunidade e força para vencer todas as etapas.

Muito obrigada.

**“The only thing that we know is that we know nothing, and
that is the highest flight of human wisdom.”**

— Leo Tolstoy

Resumo

ARANHA, Bianca Camargo. **Análise metabolômica não-direcionada de pimentas (*Capsicum* spp.) por CG-EM.** 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e compreende mais de 30 espécies, seus frutos são popularmente conhecidos como pimenta e já eram utilizados por povos nativos como temperos, conservantes alimentícios e em medicamentos. Com a finalidade de estudar e conservar a biodiversidade das espécies de *Capsicum*, a Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) mantém um Banco Ativo de Germoplasma (BAG), o qual necessita de caracterizações agrônômica, morfológica, genética, metabólica e de potencial tecnológico, possibilitando assim o conhecimento de seus indivíduos, auxiliando na seleção para diferentes aplicações. O conhecimento do total de compostos presentes nas pimentas pode ser obtido através da estratégia de análise metabolômica. Assim, objetivou-se caracterizar o perfil metabólico de 61 acessos de pimentas do BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado das espécies *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas em dois extratos (fração polar A e B). Foi observada grande diversidade de compostos como aminoácidos, açúcares simples, ácidos orgânicos, capsaicinoides, esteróis e ésteres. Os teores de aminoácidos variaram entre 3,7 e 13,4mg.g⁻¹ de massa seca (ms) sendo que a L-asparagina predominou em 75% dos acessos. Os teores de açúcares totais variaram entre 45,0 e 189,8mg.g⁻¹ ms, sendo o mais abundante a frutose, representando em média 59%. Na maioria dos acessos avaliados houve predominância do ácido cítrico em concentrações de até 11,3mg.g⁻¹ ms. O total de ácidos orgânicos foi quantificado entre 2,4 e 15,2mg.g⁻¹ ms. A capsaicina representou 59% do total de capsaicinoides avaliados enquanto a dihidrocapsaicina representou 30%. Não foram identificados capsaicinoides para os acessos P27 e P179 (*C. baccatum*), P135 (*C. chinense*) e P46 (*C. annuum*). Hidrocarbonetos e ésteres apresentaram teores entre 0,2–14,6mg.g⁻¹ ms e 0,5–57,9mg.g⁻¹ ms, respectivamente. A análise de componentes principais (PCA) da fração polar A, não evidenciou a formação de *clusters* por espécies. Separaram-se do grupo (*outliers*) os acessos P116 (*C. chinense*), P46 e P76 (*C. annuum*), principalmente em função da maior concentração de sacarose e frutose presentes nestes acessos. A PCA da fração polar B, indicou separação dos acessos P221 (*C. annuum*) e P200 (*C. chinense*), em função do elevado teor de dihidrocapsaicina nestes acessos. A caracterização do perfil metabólico por CG-EM permitiu a identificação e quantificação simultânea de 90 compostos. Estes resultados ampliam e complementam a base de dados metabólica do BAG de *Capsicum* spp..

Palavras-chave: perfil metabólico; ácidos orgânicos, capsaicinoides; açúcares; aminoácidos.

Abstract

ARANHA, Bianca Camargo. **Untargeted metabolomic analysis of peppers (*Capsicum* spp.) by GC-MS**. 2016. 74f. Dissertation (Master Degree in Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The genus *Capsicum* belongs to the Solanaceae family and comprises more than 30 species, their fruits are popularly known as pepper and were used by native people as spices, food preservatives, and medicines. With the purpose of studying and conserving the biodiversity of species of *Capsicum*, Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) maintains an Active Germplasm Bank (AGB), which requires agronomic, morphological, genetic, metabolic, and technological potential characterizations, thus enabling the knowledge of the individuals, supporting the selection for different applications. The knowledge of the total of compounds present in peppers can be obtained by metabolomic analysis strategy. Therefore the objective was to characterize the metabolic profile of 61 accessions of peppers from Embrapa Clima temperado *Capsicum* AGB including *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens* by Gas Chromatography and Mass Spectrometry in two extracts (polar fraction A and B). It was observed wide variety of compounds such as amino acids, simple sugars, organic acids, capsaicinoids, steroids, and esters. The amino acid content varied between 3.7 and 13.4mg g⁻¹ dry weight (dw) and L-asparagine predominated in 75% of the accessions. Total sugar content ranged between 45.0 and 189.8mg g⁻¹ dw, the most abundant was fructose representing on average 59%. In most accessions citric acid predominated reaching concentrations of up to 11.3mg g⁻¹ dw. Total organic acid content was quantified between 2.4 and 15.2mg g⁻¹. Capsaicin represented 59% of total capsaicinoids evaluated while dihydrocapsaicin represented 30%. Capsaicinoids were not identified for accessions P27 and P179 (*C. baccatum*), P135 (*C. chinense*) and P46 (*C. annuum*). Hydrocarbons and esters were present in concentrations between 0.2–14.6mg g⁻¹ dw and 0.5–57.9mg g⁻¹ dw respectively. Principal component analysis (PCA) of polar fraction A did not show the formation of clusters by species. Separated from the main group (outliers) were P116 (*C. chinense*), P46 and P76 (*C. annuum*), mainly due to the higher concentration of sucrose and fructose present in these accessions. PCA of polar fraction B, indicated the separation of P221 (*C. annuum*) and P200 (*C. chinense*), due to the high content dihydrocapsaicin of these accessions. The characterization of the metabolic profile by GC-MS allowed simultaneous identification and quantification of compounds 90. These results extend and complement the metabolic database of the AGB of *Capsicum* spp..

Keywords: metabolic profile; organic acids, capsaicinoids; sugars; amino acids.

Lista de Figuras

Figura 1	Zonas de origem e expansão pré-colombiana de quatro espécies do gênero <i>Capsicum</i>	18
Figura 2	Diversidade de cor e formato em frutos de duas espécies de <i>Capsicum</i>	19
Figura 3	Fórmula estrutural dos principais capsaicinoides presentes em <i>Capsicum</i>	27
Figura 4	Fórmula estrutural dos principais carotenoides presentes em <i>Capsicum</i>	29
Figura 5	Variabilidade genética de fruto em acessos de <i>Capsicum annuum</i>	29
Figura 6	Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos.....	31
Figura 7	Esquema do processo de análise em metabolômica.....	34
Figura 8	Ilustração do preparo dos cromatogramas para obtenção do percentual do Desvio Padrão Relativo (DPR%) em extratos de <i>Capsicum spp.</i>	40
Figura 9	Distribuição do Desvio Padrão Relativo (DPR%) para o total de metabólitos em quatro amostras de controle de qualidade.	43
Figura 10	Representação gráfica do teor de metabólitos (mg.g^{-1} de ms) em 61 acessos de pimentas (<i>Capsicum spp.</i>) do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	46
Figura 11	Representação gráfica do teor de metabólitos (mg.g^{-1} de ms) em 61 acessos de pimentas (<i>Capsicum spp.</i>) do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	47
Figura 12	Plotagem dos <i>Scores</i> e <i>Loadings</i> da análise de componentes principais na fração polar A em 4 espécies de <i>Capsicum</i> oriundas do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	57
Figura 13	Perfil metabólico por CG-EM do extrato da fração polar A do acesso P116 (<i>C. chinense</i>).....	59
Figura 14	Perfil metabólico por CG-EM do extrato da fração polar A do acesso P76 (<i>C. annuum</i>).....	60

Figura 15	Plotagem dos <i>Scores</i> e <i>Loadings</i> da análise de componentes principais na fração polar B em 4 espécies de <i>Capsicum</i> oriundas do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	61
Figura 16	Perfil metabólico por CG-EM do Extrato da fração polar B do acesso P221 (<i>C. annuum</i>).....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1	Acessos de <i>Capsicum</i> do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.....	38
Tabela 2	Conteúdo total de diferentes classe de metabólitos em frutos de 4 espécies de pimentas (<i>Capsicum</i> spp.).....	44
Tabela 3	Descrição dos principais metabólitos da fração polar A encontrados por CG-MS em 61 acessos de frutos de <i>Capsicum</i>	50
Tabela 4	Descrição dos principais metabólitos da fração polar B encontrados por CG-MS em 61 acessos de frutos de <i>Capsicum</i>	53

Lista de Abreviaturas e siglas

BAG	Banco Ativo de Germoplasma
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas
DPR%	Desvio Padrão Relativo (%)
EI	Impacto de elétrons (do inglês: <i>electron impact</i>)
Ev	Elétron volt
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês: <i>fatty acid methyl esters</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IK	Índice de tempo de retenção (Índice de Kovats)
m/z	Razão massa/carga
Ms	Massa seca
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês: <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
PC	Componente Principal (do inglês: <i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês: <i>Principal Component Analysis</i>)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (do inglês: <i>Partial Least Squares</i>)

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 Revisão Bibliográfica.....	17
3.1 <i>Capsicum</i>	17
3.2 Características Agronômicas de <i>Capsicum</i>	18
3.3 Metabolismo Geral e Especializado.....	20
3.3.1 Metabolismo Geral em Plantas.....	21
3.3.1.1 Açúcares.....	21
3.3.1.2 Aminoácidos.....	22
3.3.1.3 Ácidos Orgânicos.....	23
3.3.2 Metabolismo Especializado em <i>Capsicum</i>	24
3.3.2.1 Capsaicinoides.....	24
3.3.2.2 Carotenoides.....	27
3.3.2.3 Compostos fenólicos.....	29
3.4 Metabolômica.....	32
4 Materiais e Métodos.....	37
4.1 Material Vegetal.....	37
4.2 Perfil Metabólico por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	38
4.3 Tratamento de Dados.....	40
4.3.1 Desvio Padrão Relativo.....	40
4.3.2 Análise de Componentes Principais.....	40
5 Resultados e Discussão.....	42
6 Considerações Finais.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

1 Introdução

O gênero *Capsicum* é nativo da América tropical e espécies foram domesticadas pelos povos nativos da região que a utilizavam na condimentação e conservação de alimentos e com fins medicinais (ROYS, 1931). Com o “descobrimento” da América os colonizadores observaram, dentre outras espécies domesticadas, os frutos de *Capsicum*, que possuíam maior pungência e características diferentes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). Assim, os frutos foram incluídos nas suas especiarias e em virtude da sua capacidade de adaptação e produção foram disseminados pelo mundo, iniciando pela Europa e posteriormente África e Ásia (REIFSCHNEIDER, 2000).

As plantas desse gênero tem tanto a capacidade de autofecundação, como de polinização cruzada e mais de 30 espécies já foram identificadas e apresentam frutos de variadas formas, cores, grau de pungência e tamanho (REIFSCHNEIDER, 2000; RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008; ZENI e BOSIO, 2011).

A pimenta é utilizada em preparações culinárias, por apresentar características sensoriais atrativas, como sabor, pungência e cor. No entanto, este fruto tem sido muito estudado em diversos modelos farmacológicos pela associação como alimento saudável, fator fortemente relacionado a sua composição química. Os frutos de *Capsicum* são fonte de diversos compostos com potencial benéfico à saúde, como exemplo, ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (provitamina A), tocoferóis (vitamina E), flavonoides e capsaicinoides (HOWARD e WILDMAN, 2007).

Matrizes vegetais são altamente complexas e produzem para a sua sobrevivência e adaptação ao meio, diversos compostos de ocorrência restrita a grupos taxonômicos além dos de ocorrência geral, comum a todos os indivíduos do mesmo reino. Estes compostos de ocorrência restrita são conhecidos como metabolismo especializado (ou secundário) e podem ser produzidos como estratégia de defesa pela planta frente aos diferentes estresses. Os compostos do metabolismo especializado das plantas tem sido alvo de muitos estudos por também promoverem benefícios à saúde humana. Além do apelo existente relacionado ao metabolismo especializado, muitos compostos do metabolismo geral (ou primário) estão também envolvidos na promoção de defesa da planta (fornecimento do aporte de carbono) e são relevantes para nutrição humana (vitaminas e aminoácidos).

Dessa maneira fica evidente a necessidade de explorar e conhecer cada vez mais o perfil de compostos pertencentes a um indivíduo. A análise metabólica em vegetais se baseia na caracterização do total de compostos decorrentes do metabolismo geral ou especializado, presentes em um extrato e num determinado momento da vida da planta (BINO et al., 2004). Tal estratégia de análise tem sido utilizada, entre outras aplicações, na obtenção de informações da variabilidade metabólica de germoplasmas e na comparação entre espécies de um gênero (KEURENTJES et al., 2006).

Considerando trabalhos anteriores promovendo a caracterização dos diversos acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (NEITZKE, 2008; NEITZKE, 2012; VASCONCELOS, 2012; ACUNHA, 2013; DAMBROS, 2014; PADILHA, 2014), acredita-se que a estratégia analítica holística de determinação do perfil metabólico de diferentes extratos de acessos *Capsicum* permitirá ampliar as informações acerca do potencial metabólico dos acessos do BAG.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Utilizar a análise de perfil metabólico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas como ferramenta para caracterizar acessos de pimentas (*Capsicum* spp.).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar 61 acessos de pimentas do BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, utilizando a análise de perfil metabólico por CG-EM.
- b) Identificar e quantificar compostos de 61 acessos de pimentas do BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, em extratos de diferentes polaridades.
- c) Gerar informações para o enriquecimento da biblioteca de metabólitos do gênero *Capsicum* spp.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 *Capsicum*

Mesmo sendo nativas da América, as espécies de *Capsicum* têm sido cultivadas em diversas regiões do globo, como na Ásia, África e países ao longo do Mediterrâneo. Seus frutos são utilizados como alimentos, conservantes alimentícios, especiarias, medicamentos tópicos e na indústria bélica, como spray de pimenta (KIM et al., 2007).

Antes mesmo da colonização da América, os nativos já haviam domesticado espécies de plantas, entre elas, espécies do gênero *Capsicum*, das quais os frutos eram também utilizados como tempero, além de auxiliar na conservação dos alimentos (REIFSCHNEIDER, 2000).

Roys (1931) ao estudar formulações de medicamentos descritas por povos Maias observou a utilização de frutos do gênero *Capsicum* em diversas misturas farmacológicas. Essa ação terapêutica observada pelos povos antigos está sendo vinculada aos seus compostos flavonoides, carotenoides, capsaicinoides e capsinoides (SIVIERO, 2002; ROSA et al., 2002).

Muitas espécies conhecidas hoje, tiveram origem em diversos pontos do continente americano. Na América tropical originou-se a *C. chinense*, ao longo da região dos Andes a espécie *C. pubescens*, a *C. annum* originou-se onde atualmente é o México, a *C. frutescens* nas regiões tropical e subtropical da América e ao Sul da América do Sul originou-se a espécie *C. baccatum* (Figura 1) (NUEZ et al., 1996; MARTIN et al., 1979).

Com a chegada dos colonizadores portugueses e espanhóis na América, o gênero foi espalhado por diversas regiões, chegando primeiramente na Europa e a partir daí, na Ásia e África. Atualmente os frutos de *Capsicum* são produzidos e consumidos em todo o mundo (ANDREWS, 1984).

Os frutos do gênero *Capsicum*, embora também chamados de pimentas não apresentam parentesco com a pimenta rosa (*Schinus molle* L.), a pimenta do reino (*P. nigrum* L.) e a pimenta da jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl.). Mesmo esses frutos tendo o nome popular em comum e sendo utilizados como temperos nos alimentos, suas propriedades químicas são distintas (CARVALHO et al., 2006).

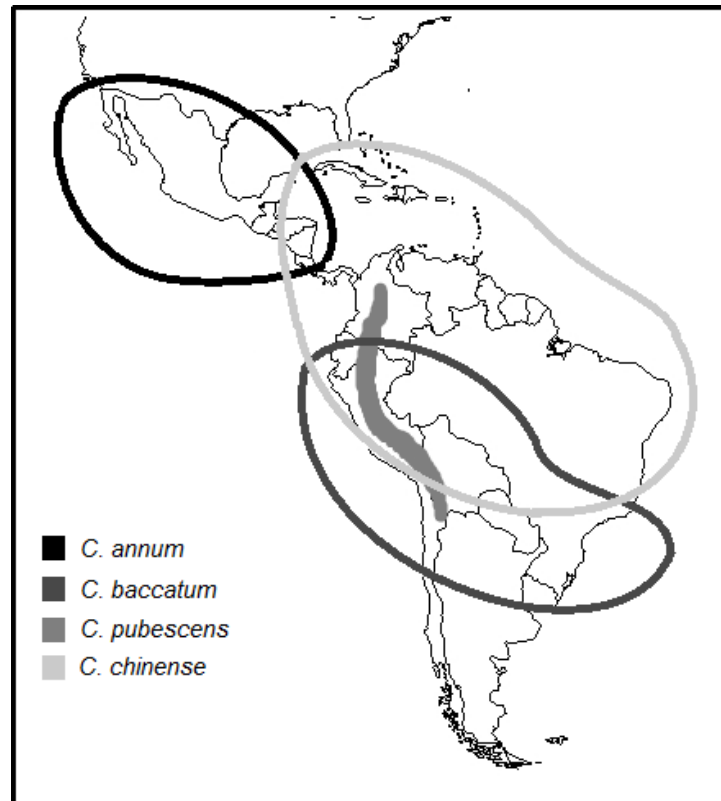


Figura 1 – Zonas de origem e expansão pré-colombiana de quatro espécies do gênero *Capsicum*

Fonte: adaptado de NUEZ et al., 1996.

3.2 Características agrônômicas de *Capsicum*

O gênero *Capsicum* é originário da zona tropical úmida da América Central e do Sul, pertencente à família Solanaceae, compreende mais de 30 espécies perenes e as mais conhecidas são: *C. annum*; *C. frutescens*; *C. chinense*; *C. pubescens*; e *C. baccatum*. Essas espécies são consideradas domesticadas, com frutos de variadas formas, cores, grau de pungência e tamanho (LANNES et al., 2007; ZENI e BOSIO, 2011). Este gênero tem sua reprodução facilitada porque plantas são autógamas e também possibilitam polinização cruzada entre espécies do gênero, causando alterações morfológicas e promovendo a diversidade (Figura 2) (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008; REIFSCHNEIDER, 2000; RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008).

A espécie *C. annum* tem grande representação comercial e a variedade amplamente consumida é conhecida popularmente como pimentão (pimenta doce). Esses frutos são consumidos *in natura*, como salada e principalmente utilizados

como tempero. Essa espécie apresenta uma flor por nó e no momento da abertura floral, podem postar-se eretas, pendentes ou inclinadas, com flores brancas e cálice pouco dentado nos frutos (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

A pimenta malagueta, muito conhecida por ser extremamente pungente é representante da espécie *C. frutescens*, essas possuem flores branco-esverdeadas e porte ereto (NUEZ et al., 1996).



Figura 2 - Diversidade de cor e formato em frutos de duas espécies de *Capsicum* (*C. baccatum*: P287, P270, P79, P108, P284, P27, P280, P283, P197 e *C. chinense*: P272, P171 e P247)

Foto: Bianca Camargo Aranha.

A *C. chinense* é uma espécie que possui peculiaridade entre as demais, por ter uma constrição no cálice dos frutos, esses são sem dentes e geralmente pendentes e segundo Reifschneider (2000), é caracterizada por ser fortemente pungente. A nomenclatura dada a esta espécie foi um equívoco por parte do holandês Nikolaus Joseph Von Jacquin por pensar que esta espécie era nativa da China, uma vez que na época já era conhecido que o gênero *Capsicum* foi originário na América (BOSLAND e VOTAVA, 1999).

A espécie *C. baccatum*, inclui a variedade popularmente conhecida como Dedo-de-moça, uma das mais comercializadas no Brasil. Essa espécie possui flores brancas com manchas amarelo-esverdeadas na base de cada pétala, com cálices dentados e frutos geralmente pendentes (CARVALHO et al., 2006).

Em nível mundial, nos anos de 2012 e 2013 os principais países produtores de pimentas e pimentões verdes foram China (continental), México e Turquia com 1,5, 2,3 e 2,1 milhões de toneladas/ano, respectivamente. Para frutos secos nesses menos anos, destacaram-se Índia, China (continental) e Peru com média de 1.340, 295 e 163 mil toneladas/ano (FAOSTAT, 2016). No Brasil, devido à produção e comercialização ser realizada principalmente por pequenos produtores é difícil obter dados precisos em relação ao cultivo e consumo de pimentas do gênero *Capsicum*, mas estima-se que o cultivo anualmente seja de aproximadamente cinco mil hectares com produção em torno a 75 mil toneladas (RIBEIRO et al., 2016). Segundo estimativa da EMATER-DF, o Brasil tem um consumo per capita de *Capsicum* em torno de 2 g.dia⁻¹, considerando tanto o fruto *in natura* quando em alimentos como temperos (FERREIRA, ALMEIDA e BÔAS, 2016).

3.3 Metabolismo geral e especializado

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas pelo homem e transformadas em alimento, bebida, abrigo, ornamentação, produção de têxteis, corantes e como fonte medicinal. Com o avanço da ciência e tecnologia têm-se aprimorado as técnicas para o isolamento dos compostos de interesse para a indústria de alimentos, cosméticos e fármacos (PLETSCH, 1998). Esses compostos são produzidos naturalmente pelo metabolismo da planta e utilizados para sua sobrevivência.

O metabolismo nos seres vivos compreende as diversas reações químicas que ocorrem nas células de indivíduos de cada reino. Este conjunto de reações garante a vida por obtenção de energia, formação dos tecidos e defesas. O reino *Plantae* abrange indivíduos que não tem a possibilidade de movimentar-se para evitar seus predadores. Ao invés disso, diversas vias biossintéticas evoluíram para estruturação das defesas das plantas. O metabolismo geral (primário) garante as funções básicas que são comuns a todas as plantas, como a formação de ácidos nucleicos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos.

O metabolismo especializado (secundário) é conhecido por não estar relacionado com as funções essenciais à vida das plantas, mas sim na manutenção de sua sobrevivência por produzirem uma série de compostos envolvidos na defesa

contra predadores e estresses e como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes (INGKANINAN et al., 1999). Muitos compostos decorrentes do metabolismo especializado das plantas são associados a um determinado gênero (MANN et al., 1994), como o caso dos capsaicinoides, alcaloides exclusivos em pimentas do gênero *Capsicum*.

Mesmo havendo distinção entre os tipos de rotas biossintéticas elas estão interligadas, uma vez que o metabolismo geral fornece precursores para o especializado e em ambos, um conjunto de enzimas é responsável pelas vias de formação dos compostos (BRATT, 2000).

Diversas classes de compostos decorrentes do metabolismo especializado estão envolvidos na proteção contra danos físicos, biológicos ou na garantia de proliferação da planta, são exemplos: antocianinas, taninos, glicosinolatos, terpenos, cumarinas, alcaloides e outros (HARTMANN, 1996). No entanto, muitos estudos têm mostrado compostos do metabolismo geral envolvidos nas estratégias de defesa das plantas, uma vez que o grande número de unidades de carbono para a formação dos compostos do metabolismo especializado utilizado na defesa, não ocorre sem a mobilização e resposta do metabolismo geral (BOLTON, 2009).

3.3.1 Metabolismo geral em plantas

3.3.1.1 Açúcares

A atividade mais vital para a planta é a fotossíntese a partir da qual se obtêm a formação de açúcares. Nas plantas, os açúcares desempenham diversas funções como componentes estruturais, intermediários de metabólitos ou armazenamento. Açúcares como a sacarose, glicose e frutose estão envolvidos em diversas funções do metabolismo da planta, como por exemplo, na síntese de carboidratos mais complexos como o amido e a celulose. Os açúcares são também importantes constituintes na formação de aminoácidos e ácidos graxos (SMEEKENS, 2000).

Historicamente, a sacarose tem sido citada principalmente como transportador de carbono para partes vegetais não fotossintetizantes ou como fornecedor de energia, transportada através da seiva da planta, tem a capacidade de passar por uma série de membranas. Com o avanço da ciência, tem-se observado

os açúcares como reguladores de expressão de genes pela chamada “*sugar sensing pathway*” (LEMOINE, 2000).

Linhas de pesquisa tem estudado a fundo a função dos açúcares como sinalizadores, e sua importância no controle de expressão de genes. A ação de sinalização desses compostos tem efeito ao longo de todas as etapas de vida da planta, atuando desde a germinação da semente, ao longo do desenvolvimento da planta e até novo ciclo reprodutivo. Embora conceitualmente qualquer açúcar possa demonstrar-se como sinalizador, essa função tem sido observada principalmente para a sacarose e hexoses (CARLSON, 1998; GANCEDO, 1998).

A via de transporte de açúcares tem sido associada principalmente com a sacarose por ser um açúcar não-redutor e de relativa sensibilidade para o metabolismo da planta. Foram identificados em diversas espécies de plantas (dicotiledóneas e monocotiledóneas) aproximadamente 20 cDNAs diferentes que codificam para transportadores de sacarose e este número está a crescer como o avanço de estudos (LEMOINE, 2000).

3.3.1.2 Aminoácidos

Aminoácidos são unidades estruturais básicas que compõem proteínas e enzimas, podendo também atuar como precursores de hormônios, componentes de parede, coenzimas e nucleotídeos. Quimicamente, os aminoácidos são ácidos orgânicos com um ou mais grupamentos amina na outra extremidade. Os aminoácidos também são moléculas importantes de transporte de nitrogênio pela planta e como fonte de carbono e devido a isso são compostos altamente controlados, desde a biossíntese até a degradação (PRATELLI e PILOTI, 2014).

A síntese da glutamina, por exemplo, é a única via que permite a assimilação de um átomo inorgânico a moléculas orgânicas e em alguma etapa, todos os compostos nitrogenados estão ligados a glutamina ou ao ácido glutâmico de alguma maneira (BERNARD e HABASH, 2009).

Esses compostos decorrentes do metabolismo geral estão fortemente envolvidos na síntese de compostos alcaloides, fenilpropanoides e glicosinolatos do metabolismo especializado das plantas (PRATELLI e PILOTI, 2014).

Na síntese dos aminoácidos, estão envolvidos os compostos intermediários da glicólise, via das pentoses e ciclo do ácido cítrico. Histidina, fenilalanina, tirosina e triptofano (aminoácidos aromáticos), são decorrentes de compostos da via das pentoses; valina, leucina, alanina, glicina e cisteína da glicólise e os aminoácidos do ciclo do ácido cítrico são glutamina, prolina, arginina (2-oxoglutarato), asparagina, lisina, treonina, metionina, isoleucina (aspartato) (PRATELLI e PILOTI, 2014).

Em culturas agrícolas os aminoácidos podem ser usados como suplementos, uma vez que pequenas quantidades estão envolvidas na ativação de diversas funções fisiológicas da planta e suas implicações produzem compostos de interesse. O hormônio etileno que desempenha funções de senescência das folhas e amadurecimento dos frutos tem sua síntese a partir do aminoácido metionina (MOHR e SCHOPFER, 1995). A tirosina e a fenilalanina são precursores de compostos fenólicos e lignina que estão envolvidos na resistência das plantas a estresses e fortalecimento estrutural (SINHA, 2004).

O acúmulo de prolina tem sido relacionado a estresse em plantas, podendo ser até 100 vezes maior que em situação normal. Dentre diversas situações de estresse, estudos mostram o metabolismo de prolina frente ao estresse osmótico e vem sendo relacionado a um mecanismo de tolerância da planta (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008). Essa tolerância está relacionada a atividade contra espécies reativas, uma vez que a salinidade e a seca são indutores de estresse oxidativo (SMIRNOFF e CUMBES, 1989). Tem-se observado também a prolina na função de tamponar o pH do citosol e como chaperonas de proteínas (MAGGIO et al., 2002).

3.3.1.3 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos são compostos que contêm grupos carboxilas em sua estrutura. Esses compostos em especial os de baixa densidade desempenham diversas funções vitais nas plantas, como citrato, malato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato serem intermediários ao ciclo de Krebs, via de produção de energia (RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2011). Esses compostos estão envolvidos tanto no anabolismo quanto no catabolismo e muitos produtos intermediários ou finais são formados. São precursores de várias moléculas, como ácido chiquímico para a produção de aminoácidos aromáticos, flavonoides, alcaloides, e lignina

(HERRMANN, 1995). Esses compostos de baixo peso molecular também participam como intermediários das vias de produção de compostos do metabolismo geral como proteínas, lipídeos e carboidratos (BENNET-CLARK, 1993).

Alguns autores propuseram esses compostos como marcadores uma vez que ácidos orgânicos como cítrico, láctico, fórmico, málico, oxálico e succínico tem seus teores aumentados em plantas com deficiência de fósforo. Ácidos orgânicos desempenham funções de resistência nas plantas, uma vez que citrato, oxalato e malato auxiliam desintoxicação e transporte de metais (MA, 2000; RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2011). Inversamente, a exsudação de ácidos orgânicos pelas radículas das plantas facilita a absorção de metais como ferro, zinco, alumínio, níquel e outros por favorecer a solubilidade ou a quelação (LONERAGAN, 1997; WANG et al., 2003).

O mecanismo de desintoxicação de alumínio, por exemplo, está associado à capacidade de produção de ácidos orgânicos por parte da planta, principalmente o ácido cítrico e a partir dele formação de quelatos. No mecanismo de exclusão há aumento do pH para além de 5, assim o alumínio precipitado liga-se aos ácidos carboxílicos da parede celular e não fica disponível para o plasma da planta. Outra maneira está relacionada a inativação dentro da planta, na qual o alumínio é ligado a ácidos orgânicos e armazenado no citoplasma e vacúolos das células (MATSUMOTO et al., 1976; MENOSSO et al., 2001).

Concentração e presença dos ácidos orgânicos são dependentes do tipo e da parte da planta, espécie, condições do solo e estresse a que são submetidas. Esses compostos estão presentes em todos os organismos vegetais e nos frutos, influenciam o sabor e aroma além da estabilidade e manutenção de qualidade (SANTOS et al., 2013).

3.3.2 Metabolismo especializado em *Capsicum*

3.3.2.1 Capsaicinoides

A pimenta é usualmente utilizada como tempero para diversas preparações culinárias, devido a suas típicas características organolépticas. Este fruto tem sido muito estudado em modelo farmacológico devido a associação como alimento

saudável, fator fortemente relacionado aos seus compostos. Atenção especial tem sido dada a classe dos capsaicinoides, compostos de ocorrência específica em espécies do gênero *Capsicum*.

No gênero *Capsicum* a pungência é conhecida como a característica mais marcante dos seus frutos (REIFSCHNEIDER, 2000). Essa característica é causada por compostos alcaloides produzidos e armazenados principalmente na região placentária (ISHIKAWA et al., 1998) denominados capsaicinoides.

Os capsaicinoides já são conhecidos pelo potencial farmacológico, e alguns estudos tem demonstrado ação clínica devido a propriedades antioxidante, anticâncer, antiartrítica, antimicrobiana, anti-inflamatória, termogênica e analgésica (LUO et al., 2010; BARBERO et al., 2014). A capsaicina e seus análogos estão relacionados a apoptose de células de câncer da próstata *in vitro* e no retardo do crescimento da massa de câncer *in vivo* (MORI et al., 2006).

Destes compostos, a capsaicina, constituinte majoritário do grupo dos capsaicinoides, tem sido estudada em diversos modelos de doenças, como no controle de neuralgia (MAIHOFNER e HESKAMP, 2013), efeitos anticancerígenos (MORI et al., 2006; LU et al., 2010; WANG et al., 2011; ANANDAKUMAR et al., 2012; MOON et al., 2012; DE-SA-JUNIOR et al., 2013; ZHANG et al., 2013), oxidação lipídica e controle de triglicerídeos (JOSSE et al., 2010; LEE et al., 2010; KANG et al., 2011) e regulação da atividade da microglia (PARK et al., 2012). Essas atividades terapêuticas tem sido muitas vezes associadas com a atividade agonista ao Receptor de Potencial Transitório Vaniloide subtipo 1 (TRPV1) (CALIXTO et al. 2005; PARK et al., 2012).

O TRPV1 constitui um entre cinco dos receptores com afinidade por compostos com radical vanilil (URBAN et al., 2011). Esses receptores são canais de cátions não seletivos e em geral, tem funções na modulação fisiológica como detecção sensorial de estímulos térmicos, mecânicos e dolorosos.

A capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) e a dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanillilnonanamida) são os principais representantes dos capsaicinoides, constituindo em geral cerca de 90% do total de compostos deste grupo (NWOKEM et al., 2010), no entanto minoritariamente podemos encontrar norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina, nonivamida, entre outros compostos relatados (Figura 3) (CONSTANT et al., 1996; GIUFFRIDA et al., 2013; HUANG et al., 2013; BARBERO et al., 2014). Os capsaicinoides são

moléculas constituídas por um grupo vanilil e um ácido graxo e em sua porção central um grupo amino (BARBERO et al., 2010). Esses compostos são sintetizados pela condensação da vanililamina, composto derivado da L-fenilalanina, com um ácido graxo de cadeia ramificada, derivado de uma valina ou leucina (BENNETT e KIRBY, 1968; LEETE e LOUDEN, 1968; STEWART et al., 2005).

Vários estudos sobre o comportamento e o acúmulo de capsaicinoides tem relatado que esses compostos são formados junto ao desenvolvimento dos frutos até o estágio final de maturação e que fatores genéticos e ambientais afetam diretamente sua concentração nos frutos (GARCES-CLAVER et al., 2007; ZEWDIE e BOSLAND, 2000). Estrada et al. (2002), observaram que o estresse hídrico proporciona um aumento do conteúdo de capsaicinoides nos frutos. Barbero et al. (2014), avaliaram a concentração dos capsaicinoides nos frutos de pimenta em diferentes graus de maturação, e observaram que há oscilações inversamente proporcionais entre os compostos capsaicina e dihidrocapsaicina nas diferentes etapas de maturação de pimentas (*Capsicum annum* L.).

O método de Scoville (1912) é uma maneira de medir e classificar o grau de pungência de pimentas, no entanto essa técnica utiliza-se de artifício sensorial e depende do treinamento e capacidade de reprodutibilidade do analisador. Métodos instrumentais têm sido utilizados para caracterizar a pungência de pimentas, a partir da quantificação dos compostos capsaicinoides, principalmente a capsaicina e a dihidrocapsaicina.

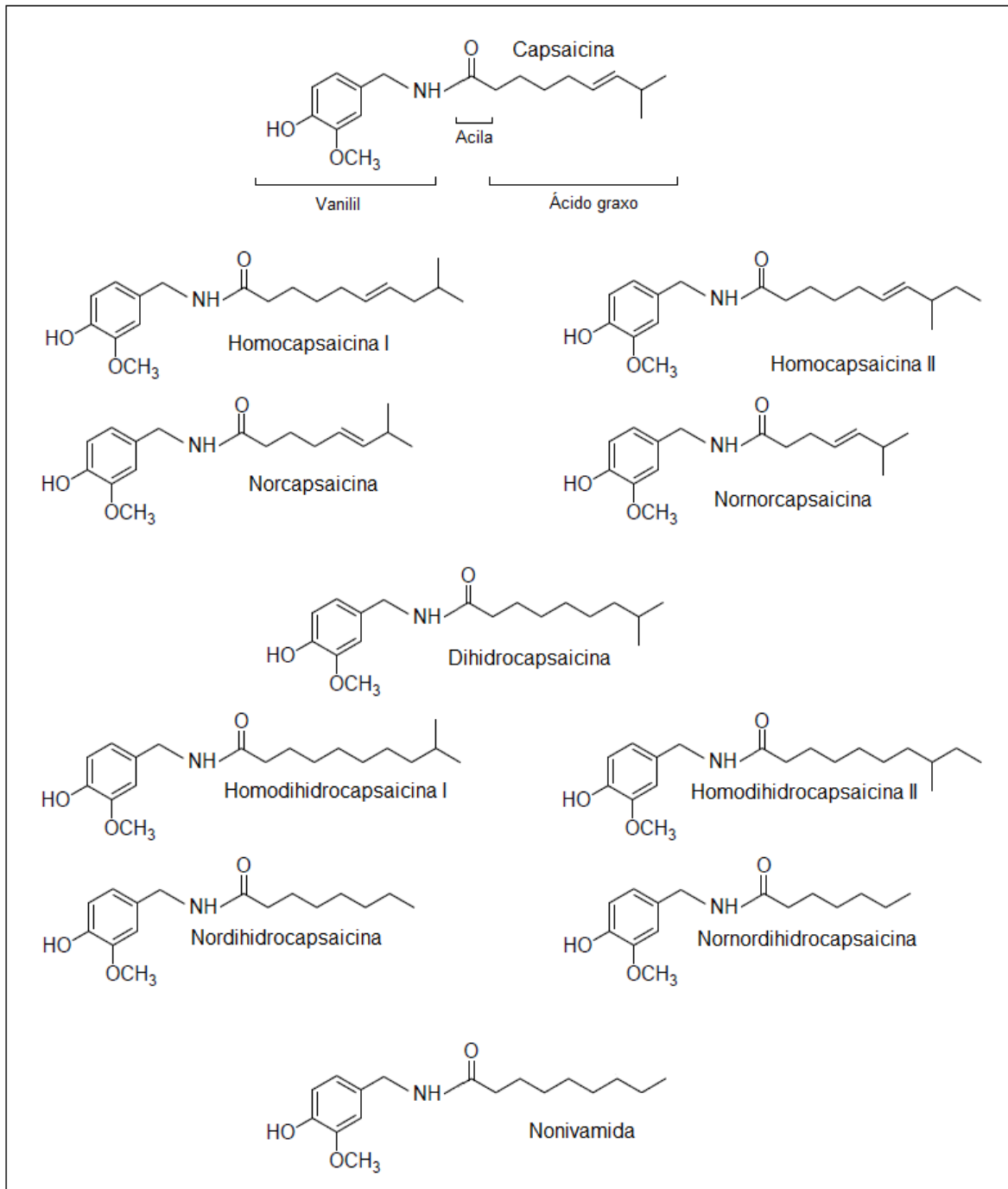


Figura 3 – Fórmula estrutural dos principais capsaicinoides presentes em *Capsicum*

3.3.2.2 Carotenoides

Os frutos de *Capsicum* são fonte de diversos compostos, como vitaminas C e E, carotenoides como capsantina e capsorubina e compostos fenólicos

(REIFSCHNEIDER, 2000). Os carotenoides são compostos naturais, tem atividade antioxidante, alguns são precursores de vitamina A e estimulam a atividade das células imunológicas, além de prevenir a formação de células tumorais, doenças cardiovasculares e degeneração muscular (DELGADO-VARGAS et al., 2000; MAOKA et al., 2001; COLLERA-ZUNIGA et al., 2005; GIUFFRIDA et al., 2013).

Mais de 600 estruturas de carotenoides já foram caracterizadas e estes compostos estão geralmente envolvidos na pigmentação de frutas, flores, vegetais e fungos e sua coloração se estende do vermelho ao amarelo (MALDONADO-ROBLEDO et al., 2003; FRASER e BRAMLEY, 2004). Esses compostos ficam armazenados nos cloroplastos complexados à proteínas por ligação não-covalente (UENOJO et al., 2007).

Os carotenoides estão destacados como sendo os principais compostos que conferem a pigmentação nas pimentas, sendo sintetizados principalmente na etapa de maturação dos frutos. Nesta etapa, ocorre a transformação dos cloroplastos em cromoplastos, há uma redução de clorofilas e os carotenoides são sintetizados (GIUFFRIDA et al., 2013). Os carotenoides são compostos tetraterpenoides (C40) que podem ser modificados por diferentes reações como hidrogenação, desidrogenação, ciclização das extremidades e adição de grupamentos laterais, migração de duplas ligações, isomerização ou combinação destes, proporcionando diversos grupos de compostos carotenoides (RODRIGUES-AMAYA, 2001; DUTTA et al., 2004; GIUFFRIDA et al., 2013).

Mais de 50 carotenoides foram identificados em frutos de *Capsicum*, dos quais, β -caroteno e capsantina predominaram em frutos vermelhos, nos frutos amarelos observaram maiores teores de luteína, α -caroteno e β -caroteno, os compostos anteraxantina, capsantina e zeaxantina predominaram em frutos alaranjados e *cis*-criptocapsina em frutos cor de chocolate (Figura 4) (GIUFFRIDA et al., 2013). A combinação destes compostos e suas diferentes concentrações nos frutos de *Capsicum* levam à variabilidade de coloração do gênero, como pode ser observada nas figuras 2 e 5.

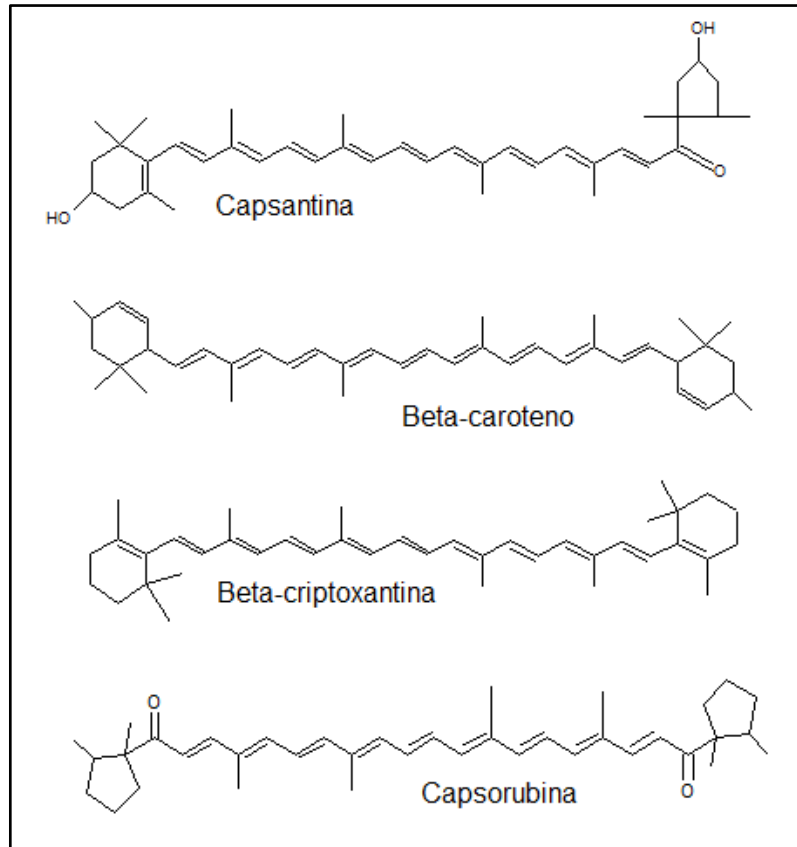


Figura 4 - Fórmula estrutural dos principais carotenoides presentes em *Capsicum*



Figura 5 - Variabilidade genética de frutos em acessos de *Capsicum annum*

Foto: Henrique K. M. Padilha.

3.3.2.3 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são decorrentes do metabolismo especializado dos indivíduos de origem vegetal, são produzidos constitutivamente e tem seus teores alterados em resposta a diversos estresses. Quimicamente os compostos fenólicos são constituídos por, pelo menos, um anel aromático onde no mínimo um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. Os compostos fenólicos podem ser classificados como fenóis, ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides, sendo que este último grupo inclui antocianinas, isoflavonas, flavonas entre outros (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000; ACUNHA, 2013).

Esses compostos quando biodisponíveis são associados à benefícios para saúde, pois sua estrutura química possibilita a neutralização de espécies reativas de oxigênio, nocivas por oxidar as células do nosso organismo (DUTHIE et al., 2000). Devido a essa atividade compostos fenólicos têm sido associados à redução do estresse oxidativo de doenças degenerativas não-transmissíveis por permitirem a homeostase quando o sistema enzimático antioxidante no organismo humano não é suficiente (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Esse estresse oxidativo tende a ser mais danoso a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (YALINKILIC e ENGINAR, 2008).

Compostos fenólicos estão associados a funções de reprodução e defesa das plantas como a atração de polinizadores e dispersores de sementes e de resistência à UV, insetos, fungos, vírus, bactérias e estresse hídrico (HÄTTERNSCHWILER e VITOUSEK, 2000). Mikulic-Petkovsek et al. (2013) avaliaram teores de compostos fenólicos em três partes (tecido saudável, infectado e tecido marginal a infecção) de *Capsicum* sp. frente ao fungo causador da antracnose. Esses autores observaram um incremento de ácido clorogênico, e glicosídeos de quercetina e luteolina no tecido ao redor da infecção do *Colletotrichum coccodes* em comparação aos tecidos saudável e infectado, sugerindo como estratégia de defesa da planta na tentativa de evitar que o fungo se espelhasse. Rodoni et al. (2015) ao avaliar o comportamento dos compostos de frutos de *C. annuum in natura* sob tratamento UV-C observaram que a radiação de 10 kJ.m⁻² induziu um acúmulo superficial de compostos fenólicos nas pimentas.

Ao avaliar frutos de *Capsicum frutescens*, Sukrasno e Yeoman (1993) observaram entre outros metabólitos não identificados, compostos fenólicos

glicosilados como os ácidos cumárico, cafeíco e 3,4-dimetoxi cinâmico e flavonoides quercetina 3-O-raminoside e luteolina 7-O-glicoside. Materska et al. (2003) identificaram para *C. annuum* oito compostos fenólicos glicosilados entre flavonoides e ácidos fenólicos.

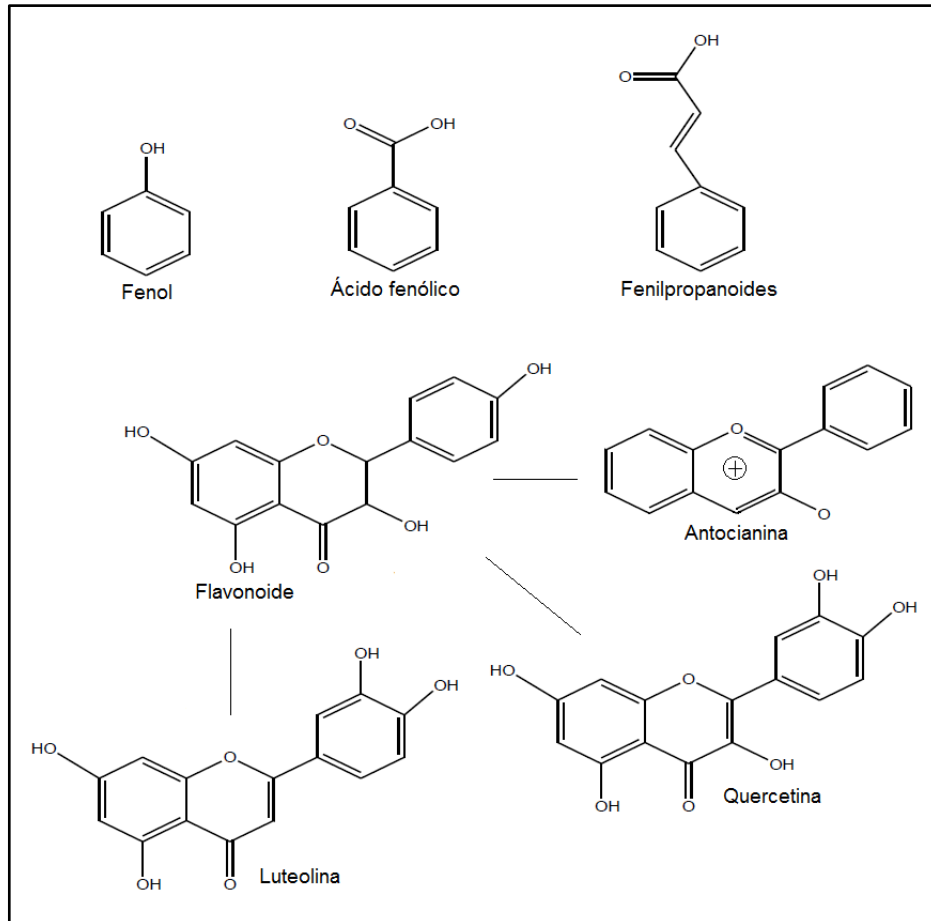


Figura 6 - Fórmula estrutural dos principais compostos fenólicos

Dentre os compostos fenólicos, as antocianinas são uma classe de metabólitos associados às cores vermelho, azul e roxo e são sintetizados em muitos tecidos vegetais (WU e PRIOR, 2005). A propriedade de cor e o potencial antioxidante das antocianinas tem sido relacionada à atração de polinizadores e dispersores de sementes bem como a resistência do tecido à foto-oxidação (AZA-GONZÁLEZ, et al., 2012). Na saúde humana, esses compostos têm sido investigados pelas propriedades antioxidante e anti-inflamatória (WANG et al., 1999). Em *Capsicum* spp., antocianinas pigmentam flores, folhas e frutos (BOROVSKI et al., 2004; SADILOVA et al., 2006).

3.4 Metabolômica

Pimentas e seus compostos têm sido investigados pelo potencial farmacológico, e são cada vez mais reconhecidas como fonte de compostos relacionados à saúde, como por exemplo, pela presença de ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides (provitamina A - xantofilas), tocoferóis (vitamina E), flavonoides e capsaicinoides (HOWARD e WILDMAN, 2007). A presença e quantidade desses compostos podem variar dependendo da espécie e das condições de clima e solo. Fatores bióticos e abióticos podem interferir diretamente no comportamento da planta, no entanto a possibilidade de caracterização metabólica é uma alternativa para selecionar espécies com maior potencial de produção de compostos de interesse e características para produção *in natura* e industrialização. A estratégia de análise por metabolômica inclui etapas como preparo de amostras (criosecação, moagem), extração dos metabólitos (solventes com diferentes polaridades), separação dos metabólitos (cromatografia líquida ou gasosa), detecção (UV, FID, MS) e tratamento de dados (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

A análise metabolômica surgiu como uma importante técnica de identificação e comparação de um vasto número de compostos em sistemas biológicos. No entanto, as plantas são seres especialmente complexos, compostos por grande diversidade de metabólitos o que torna impossível a qualquer método analítico a extração e detecção simultânea de todos os compostos presentes na matriz (DEVOS et al., 2007).

A aplicação da metabolômica em uma matriz vegetal consiste na caracterização e quantificação do total de compostos presentes no extrato (BINO et al., 2004). Tal avaliação do perfil metabólico, direcionada ou não, tem sido utilizada entre outras aplicações, para obter-se a informação da variabilidade metabólica de germoplasmas, tanto em nível de comparação entre espécies de um gênero, como para estabelecer o local de origem de diferentes indivíduos (TIKUNOV et al., 2005; KEURENTJES et al., 2006).

Zörb et al. (2006) avaliaram o perfil metabólico de grãos de trigo cultivados sob sistemas de produção orgânica e convencional nas mesmas condições de solo e clima, e observaram que não houve diferenças na composição de metabólitos em função do sistema empregado. Wahyuni et al. (2013) avaliaram a biodiversidade de

32 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.) e observaram uma identificação de 88 metabolitos semi-polares, onde destacaram-se compostos flavonoides com diferentes combinações de açúcares na porção aglicona. No perfil de compostos voláteis, Wahyuni et al. (2013) observaram correlação positiva entre a pungência das amostras e o teor de ésteres de ácidos graxos de cadeia ramificada e sugeriram associação com a atividade da enzima aciltransferase da via de formação dos capsaicinoides que também catalisa a esterificação de ácidos graxos.

A metabolômica é uma técnica com potencial aplicação no controle de qualidade de alimentos, uma vez que o acúmulo de dados pode servir como base para definir a qualidade metabólica de matrizes alimentares. Nesta tendência, adulterações podem ser identificadas pelo aparecimento de picos incomuns nas amostras. Esta técnica quando bem adaptada à amostra pode possibilitar uma detecção relativamente rápida e evitar o uso de protocolos dispendiosos e muito específicos (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

A metabolômica tem sido amplamente aplicada em alimentos, para denominação de origem, para diferenciar espécies de um gênero, examinar a influência de diferentes condições de cultivo, alterações genéticas, contaminações ou adulterações e veracidade de rótulos. No entanto, não tem sido baseada apenas na separação e quantificação dos compostos, mas também se tem aplicado à identificação de tantos compostos quando possível ou os que mais interferem para o desfecho dos resultados (TIKUNOV et al., 2005; KEURENTJES et al., 2006; ZÖRB et al., 2006; CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009; WAHYUNI et al., 2013).

Para a aplicação da estratégia metabolômica, diversos equipamentos tem sido usados nas etapas de separação (cromatografia líquida ou gasosa) e detecção (UV, FID, MS) dos metabólitos (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009) (Figura 7). A cromatografia é a principal técnica de separação de compostos em metabolômica, onde podem ser separados por polaridade (cromatografia líquida) e volatilidade (cromatografia gasosa). Por cromatografia gasosa, apenas compostos voláteis e termicamente estáveis poderão ser analisados. Alternativamente se pode derivatizar os compostos com o objetivo de aumentar sua volatilidade. Usualmente essa etapa de preparo de amostra inclui uma reação de oximação que converte aldeídos e cetonas à oximas e tem a função de evitar a isomerização, principalmente em monossacarídeos. Outra reação comumente empregada é a siliilação, que aumenta a volatilidade de grupos como hidroxilas, tióis e aminas por redução da

hidrofilicidade adicionando um substituinte trimetilsilil. Este reagente de derivatização também está relacionado à rápida reação com temperaturas relativamente baixas e sem grandes mudanças estruturais nos compostos, facilitando sua identificação (GULLBERG et al., 2004).

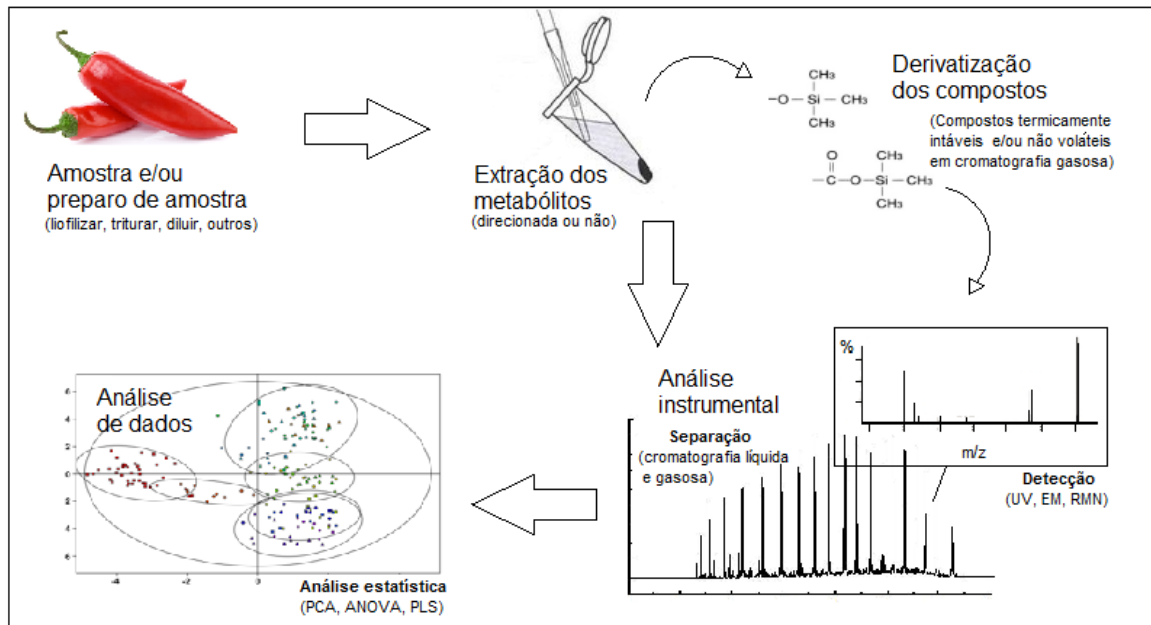


Figura 7 - Esquema do processo de análise em metabolômica

Fonte: Adaptado de CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009.

A comparação do tempo de retenção dos cromatogramas de padrões puros aos da amostra é uma maneira para a confirmação dos compostos, mas para a metabolômica o elevado número de compostos torna inviável a identificação e quantificação de todos os compostos por padrão externo. Frente a isso, utilizam-se padrões internos para a quantificação e para identificação técnicas mais avançadas como a espectrometria de massas.

Na cromatografia o uso de padrão interno possibilita quantificar compostos estruturalmente semelhantes ao padrão que deve ser inerte e estar ausente na matriz a ser analisada. Para a quantificação adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão e por comparação de área obtêm-se a concentração do composto no extrato e a partir daí, na amostra (RIBANI et al., 2004).

A técnica de detecção por espectrometria de massas permite a identificação de um composto pela comparação de seu espectro de massas a uma biblioteca ou por identificação da estrutura a partir de seus fragmentos. O princípio da

espectrometria de massas é a ionização de uma molécula, onde seus íons são separados pela razão massa/carga (m/z) e cada fração numérica é registrada em um espectro (PRESTES et al., 2009).

Acoplado ao cromatógrafo gasoso pode-se utilizar o espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons (EI), que consiste no bombardeio das moléculas vaporizadas com um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV – elétron volt), que propicia a formação de íons positivos que são registrados em um espectro pela sua relação m/z (CHIARADIA et al., 2008).

O tratamento de dados em metabolômica é feito geralmente pela aplicação de análises estatísticas multivariadas que tendem a agrupar as informações. Para melhores resultados, autores tem sugerido a normalização dos dados antes da aplicação da análise multivariada, com o intuito de corrigir desvios instrumentais como os de tempo de retenção (SON et al., 2008). As estratégias de análise de dados devem estar de acordo com o objetivo do estudo e para tratamento de dados metabolômicos podemos classificá-las como discriminativas, preditivas e informativas. A análise metabolômica informativa objetiva a caracterização da amostra a partir da identificação e quantificação do perfil de compostos do extrato, ao contrário das técnicas discriminativa e preditiva, que não necessariamente exigem a identificação dos compostos. Seja em estratégia alvo ou não, esta técnica de análise busca obter características intrínsecas, ou seja, composição metabólica da amostra e suas informações têm sido utilizadas na formação e atualização de bases de dados de metabólitos (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

A aplicação de Mínimos Quadrados Parciais ou PLS (do inglês *Partial Least Squares*), por exemplo, é uma análise estatística multivariada preditiva que possibilita prever a variável envolvida em determinada característica pela redução da dimensionalidade dos dados e maximização da correlação entre as variáveis e tem sido muito aplicada para a predição dos compostos envolvidos na determinada característica de interesse (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

PCA (do inglês *Principal Component Analysis*) ou Análise de Componentes Principais é uma estratégia discriminativa que possibilita distinguir em grupos o total de dados analisados. Tem o intuito de gerar representação linear dos dados de maneira a reduzi-los graficamente com o mínimo de perda de informações. O agrupamento das amostras é obtido quando se cria uma ortogonal das variáveis vetoriais (componentes principais). Na prática, esta análise de dados agrupa os

indivíduos pelo conjunto de variáveis que definem suas características, ou seja, as amostras avaliadas tem muitas características em comum, mas o que as separa em grupos são as variáveis próprias àquele agrupamento (VARELLA, 2008; CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

4 Materiais e métodos

4.1 Material vegetal

Foram analisados 61 acessos de *Capsicum* dos quais 34 acessos foram da espécie *C. baccatum*, 13 acessos de *C. annuum*, 12 acessos de *C. chinense* e 1 acesso de *C. frutescens* (Tabela 1). As amostras foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Os acessos analisados são variedades obtidas a partir de doação de sementes por agricultores dos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, formando um BAG com grande variabilidade genética, apresentando frutos com diferentes tamanhos, formatos, cores, pungências e potencial tecnológico como é possível observar nos trabalhos de Neitzke (2008), Neitzke (2012), Vasconcelos (2012), Acunha (2013), Dambros (2014) e Padilha (2014).

Os frutos foram coletados no período da manhã em estado completo de maturação, definido por avaliação visual da coloração. Foram coletados no campo experimental da Embrapa Clima Temperado, diferentes acessos do gênero *Capsicum* entre os meses de fevereiro a maio nas safras de 2012/2013/2014. Após a coleta, os frutos foram transportados até o laboratório para separação de frutos com lesões, folhas, pedúnculos e outras partes da planta. Os frutos sadios selecionados foram devidamente identificados (número da planta e do acesso) e congelados a -18°C.

Triturou-se 50 frutos congelados de pimenta, que foram liofilizados (Liobras, L101) e macerados em moinho de bola (Marconi, MA350) com auxílio de nitrogênio líquido, após foram novamente liofilizados para retirar totalmente a água. Esse procedimento foi realizado para todos os acessos (Tabela 1).

Tabela 1 – Acessos de *Capsicum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS

Acesso	Espécie	Acesso	Espécie
P14	<i>C. baccatum</i>	P284	<i>C. baccatum</i>
P25	<i>C. baccatum</i>	P287	<i>C. baccatum</i>
P27	<i>C. baccatum</i>	P294	<i>C. baccatum</i>
P34	<i>C. baccatum</i>	P46	<i>C. annuum</i>
P49	<i>C. baccatum</i>	P76	<i>C. annuum</i>
P50	<i>C. baccatum</i>	P100	<i>C. annuum</i>
P59	<i>C. baccatum</i>	P122	<i>C. annuum</i>
P61	<i>C. baccatum</i>	P134	<i>C. annuum</i>
P71	<i>C. baccatum</i>	P136	<i>C. annuum</i>
P79	<i>C. baccatum</i>	P137	<i>C. annuum</i>
P87	<i>C. baccatum</i>	P189	<i>C. annuum</i>
P89	<i>C. baccatum</i>	P203	<i>C. annuum</i>
P92	<i>C. baccatum</i>	P221	<i>C. annuum</i>
P101	<i>C. baccatum</i>	P258	<i>C. annuum</i>
P102	<i>C. baccatum</i>	P259	<i>C. annuum</i>
P103	<i>C. baccatum</i>	P290	<i>C. annuum</i>
P108	<i>C. baccatum</i>	P116	<i>C. chinense</i>
P117	<i>C. baccatum</i>	P135	<i>C. chinense</i>
P120	<i>C. baccatum</i>	P171	<i>C. chinense</i>
P169	<i>C. baccatum</i>	P191	<i>C. chinense</i>
P179	<i>C. baccatum</i>	P200	<i>C. chinense</i>
P197	<i>C. baccatum</i>	P228	<i>C. chinense</i>
P213	<i>C. baccatum</i>	P236	<i>C. chinense</i>
P219	<i>C. baccatum</i>	P242	<i>C. chinense</i>
P239	<i>C. baccatum</i>	P245	<i>C. chinense</i>
P241	<i>C. baccatum</i>	P246	<i>C. chinense</i>
P270	<i>C. baccatum</i>	P247	<i>C. chinense</i>
P274	<i>C. baccatum</i>	P272	<i>C. chinense</i>
P278	<i>C. baccatum</i>	P82	<i>C. frutescens</i>
P280	<i>C. baccatum</i>	P291	<i>C. sp.</i>
P283	<i>C. baccatum</i>		

4.2 Perfil metabólico por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise de perfil metabólico nos frutos de *Capsicum* ocorreu segundo metodologia proposta por Lisec et al. (2006). Para extração, pesou-se 30mg de amostras liofilizadas de pimentas em tubos de 2mL e adicionou-se 1.400µL de metanol grau HPLC pré-resfriado a -20°C, posteriormente adicionou-se 60µL de Ribitol (0,2mg.mL⁻¹ em H₂O-ultrapura), 10µL de Antrona (1mg.mL⁻¹ em clorofórmio

grau HPLC) e aplicou-se agitação por vórtice durante 10 segundos. Agitou-se em termomisturador (Eppendorf, termomixer 5436) por 10 minutos a 70°C e 900rpm. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 11.000 x g e o sobrenadante foi coletado em tubos de 15mL e adicionado de 1.500µL de água ultrapura refrigerada a 4°C, 750µL de clorofórmio grau HPLC pré-resfriado a -20°C e vórtice durante 10 segundos. Centrifugou-se (Sorvall, RC5C) por 15 minutos a 22.000 x g, transferiu-se 150µL da fração superior (metanol e água – fração polar A) para tubos de 1,5mL e 650µL da fração inferior (clorofórmio – Fração polar B) para frascos de 1,5mL.

No processo de derivatização, a fração A (150µL) foi concentrada por arraste aplicando-se nitrogênio gasoso. Adicionou-se 40µL de reagente de metoxiaminação (cloridrato de metoxiamina a 20mg.mL⁻¹ em piridina) e agitou-se por 2 horas a 37°C em termomisturador. Após, adicionou-se 70µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitou-se durante 30 minutos a 37°C. A reação foi transferida para frascos com *inserts* de 250µL e injetadas imediatamente no CG-EM.

Para análise de ambas as frações (A e B), utilizou-se equipamento Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas foram segundo Lisec et al. (2006). Injetou-se 1µL de amostra com temperatura do injetor a 230°C, com razão de *split* para injeção de 1:50 para a fração A e aplicação no modo *splitless* para a fração B. Utilizou-se hélio como gás carreador com fluxo de 2mL.min⁻¹ e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), com programação isotérmica por 2 minutos à 80°C, rampa de temperatura de 15°C por minuto até 320°C ao qual permaneceu por 6 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de 250°C, faixa de massa de 70-600m/z e 0,2 varreduras por segundo. O tempo de corte do solvente foi definido a partir de cada fração injetada. Para determinação do índice de tempo de retenção utilizou-se ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME C8-24), calculado automaticamente pelo software do equipamento.

4.3 Tratamento dos dados

4.3.1 Desvio padrão relativo

Após a integração dos picos, os dados foram normalizados de acordo com o padrão interno de cada fração antes de serem combinados e listados. A reprodutibilidade foi avaliada calculando a porcentagem do Desvio Padrão Relativo (DPR%) utilizando quatro amostras como controle de qualidade escolhendo ao acaso um acesso representante para cada espécie (*C. baccatum*, *C. annum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) (Figura 8).

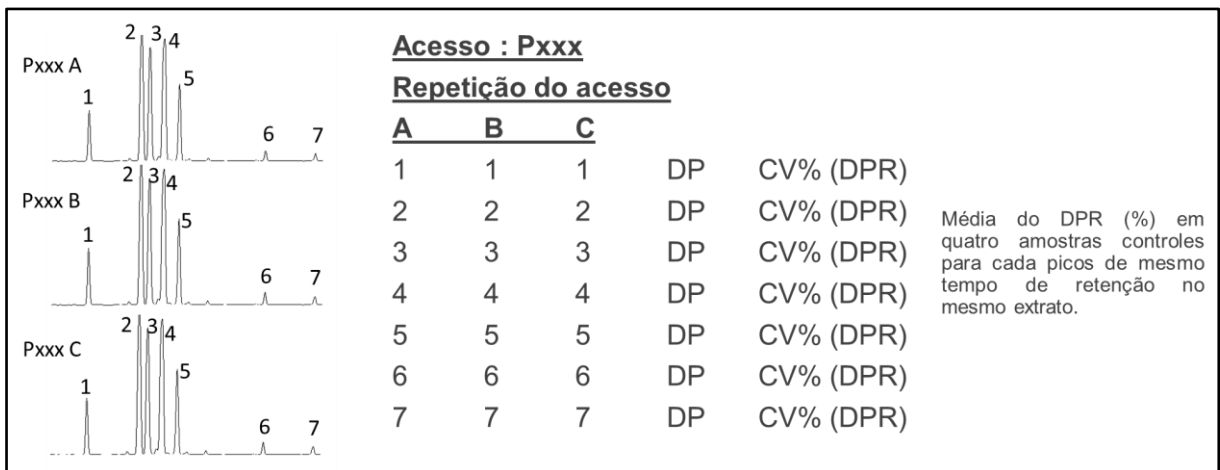


Figura 8 – Ilustração do preparo dos cromatogramas para obtenção do percentual do Desvio Padrão Relativo (DPR%) em extratos de *Capsicum* spp., ^{DP} desvio padrão, ^{CV%} percentual do coeficiente de variação

4.3.2 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o software online gratuito “Xcms Online” (link de acesso: <https://xcmsonline.scripps.edu/>). O *software* permite a análise de cromatogramas fornecendo um conjunto de dados e também possibilita a definição dos parâmetros instrumentais utilizados para a aquisição dos dados, para isso é necessário criar uma conta de usuário a partir de um *e-mail* pessoal. Para a obtenção da PCA, criou-se um trabalho de múltiplos grupos selecionando os conjuntos de dados previamente carregado *software* em formato .mzXML. Criou-se um conjunto de dados para cada espécie, onde foram

inseridas 3 repetições (cromatogramas) dos acessos pertencentes a cada espécie. Nenhum conjunto de dados foi definido para a opção Conjunto de dados de controle de qualidade (*QC Dataset*). Os parâmetros instrumentais foram GC/quadrupolo simples, GC-EI espectrometria de massas quadrupolo simples, formato do tempo de retenção em minutos e polaridade positiva e posterior submissão para análise. O programa comunicou via *e-mail* o término do processamento dos dados. Não foram alterados os parâmetros dos gráficos gerados pelo software para PCA.

5 Resultados e discussão

Foram avaliados 61 acessos de quatro espécies de pimentas *Capsicum* pertencentes ao BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Na tabela 1 é possível observar a disposição dos acessos entre as espécies. A obtenção dos resultados se baseou no estudo de perfis metabólicos em duas frações polares (A e B) decorrentes de um extrato inicial. Na figura 9 é possível observar o Desvio Padrão Relativo como demonstrativo do comportamento de variação dos resultados frente às amostras e método analítico empregados. O desvio padrão relativo em porcentagem, mais conhecido como coeficiente de variação é avaliado para apresentar a precisão do método (CASSIANO et al., 2009).

O DPR% na figura 9 (a), foi obtido a partir de 97 picos, e na figura 9 (b) 170 picos. Do total obtido na figura 9 (a), 48 picos tiveram um DPR% inferior a 10% e apenas 5% dos picos excedeu os 50% de Desvio Padrão Relativo e na figura 9 (b) 67% dos 170 compostos compreenderam um DPR% não superior a 20%. Esses resultados estão de acordo com Zhou et al. (2011) que considerou o método adequado para a determinação de perfil metabólico considerando valores próximos. A determinação de um DPR% ideal requer conhecimento do comportamento do material de estudo, há autores como Stine et al. (2012) que consideram um DPR (%) ideal quando a variação não é superior a 15% (baixa dispersão dos dados).

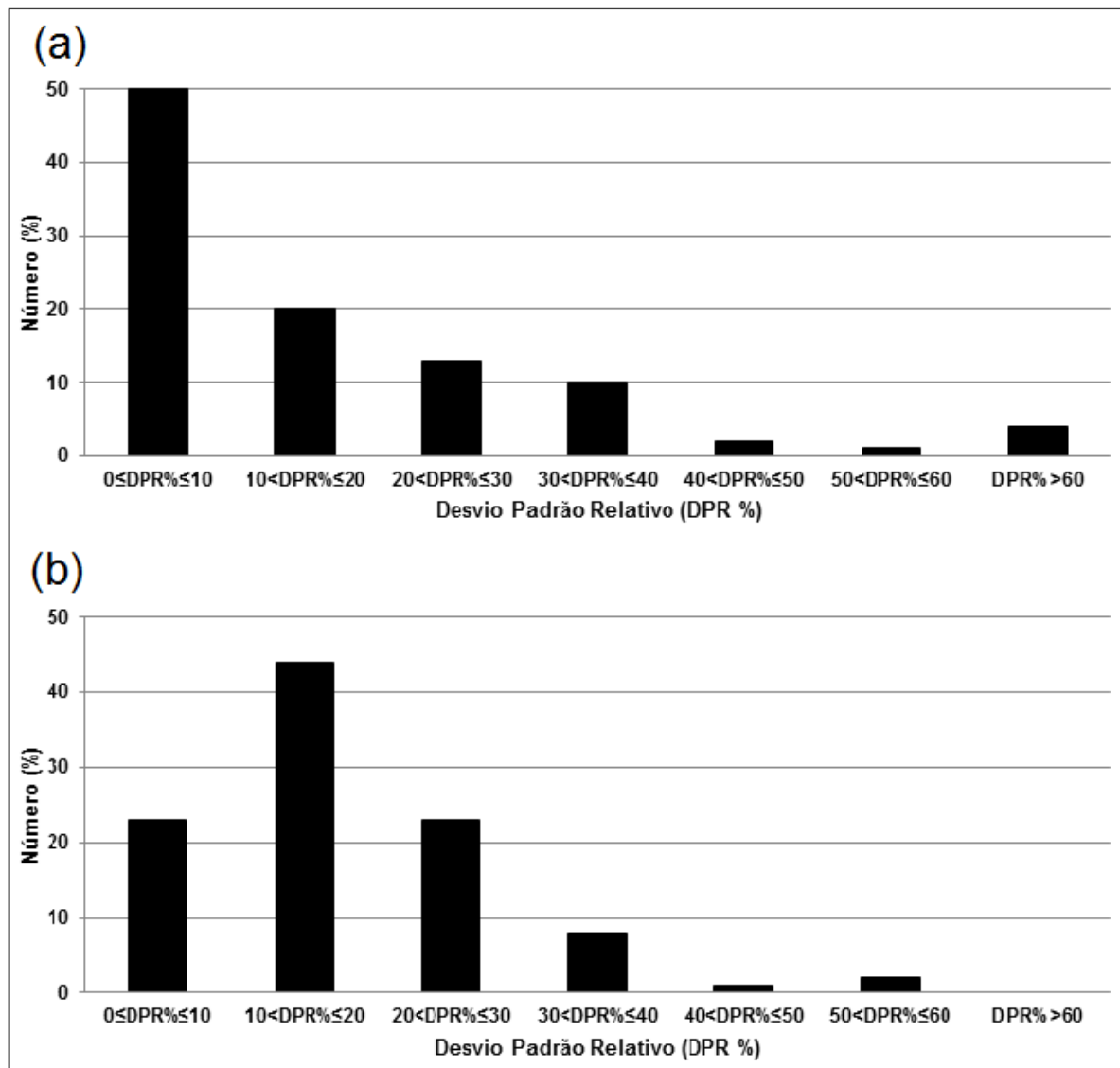


Figura 9 - Distribuição do Desvio Padrão Relativo (DPR%) para o total de metabólitos em quatro amostras de controle de qualidade. Cada coluna do gráfico representa a porcentagem do número de picos dentro da faixa especificada para o DPR%. (a) Fração polar A (metanol + água). (b) Fração polar B (clorofórmio, a partir da extração metanólica)

Dos acessos estudados, 34 eram de espécie *C. baccatum*, 12 acessos de *C. chinense*, 13 pertencentes à *C. annum*, 1 de *C. frutescens* e 1 acesso de *Capsicum* sp. (não identificada). Na tabela 2, pode-se observar a variação intra-espécie dos teores de metabólitos das classes estudadas, evidenciando a necessidade de caracterização individual dos acessos do BAG. Fatores genéticos e ambientais influenciam nas respostas metabólicas das plantas e podem estar associados a variação de compostos nos indivíduos de mesma espécie. Teores totais das classes de compostos podem ser observadas para os diferentes acessos nas figuras 10 e 11.

Tabela 2 – Conteúdo total de diferentes classes de metabólitos em frutos de 4 espécies de pimentas (*Capsicum*)

Espécie	Fração Polar A								
	Aminoácidos			Açúcares			Ácidos orgânicos		
	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV	Média	DP	CV
<i>C. baccatum</i>	6,7	1,9	28%	136,1	20,5	15%	10,0	3,1	31%
<i>C. chinense</i>	8,2	3,0	37%	126,7	27,4	22%	10,5	1,7	16%
<i>C. annuum</i>	8,1	2,8	35%	100,4	40,2	40%	10,8	2,3	21%
<i>C. frutescens</i>	4,1	-	-	64,2	-	-	10,8	-	-

Espécie	Fração Polar B								
	Hidrocarbonetos			Ésteres			Capsaicinoides		
	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV	Média	DP	CV
<i>C. baccatum</i>	2,9	3,1	107%	7,7	5,3	68%	13,6	11,5	84%
<i>C. chinense</i>	2,4	1,1	47%	7,6	9,4	124%	66,1	56,7	86%
<i>C. annuum</i>	3,0	3,1	106%	1,7	1,6	92%	31,9	19,8	62%
<i>C. frutescens</i>	0,9	-	-	2,6	-	-	54,4	-	-

Média - mg.g⁻¹ massa seca. **DP** - desvio padrão da média. **CV** - coeficiente de variação.

A figura 10 demonstra o total de três classes de compostos para cada acesso, decorrentes do perfil metabólico da Fração polar A. Entre a classe dos aminoácidos, predominou para o gênero *Capsicum* a asparagina, sendo majoritário em 47 dos 61 acessos estudados, sua contribuição média foi de 27% nos acessos em que predominou e seus teores variaram de 0,7mg.g⁻¹ até 6,17mg.g⁻¹. Para os acessos que não tiveram esse comportamento, o aminoácido norvalina se mostrou predominante em 10 acessos, *C. baccatum*: P219 (1,09mg.g⁻¹), P274 (1,29mg.g⁻¹), P280 (1,03mg.g⁻¹), P287 (1,44mg.g⁻¹), P294 (1,71mg.g⁻¹); *C. chinense*: P236 (0,61mg.g⁻¹), P247 (1,06mg.g⁻¹); *C. annuum*: P136 (1,16mg.g⁻¹), P189 (1,88mg.g⁻¹); *C. frutescens*: P82 (1,14mg.g⁻¹). Nos acessos P14 e P108 (*C. baccatum*), P46 e P290 (*C. annuum*) os aminoácidos predominantes foram respectivamente isoleucina (2,25mg.g⁻¹), serina (0,76mg.g⁻¹ e 1,63mg.g⁻¹) e prolina (1,78mg.g⁻¹). Minoritariamente também foi observada a presença dos aminoácidos alanina, valina, tirosina, glutamina, fenilalanina, teonina, lisina, cisteína, glicina, ácido aspártico e ácido glutâmico (Figura 10 a). A média de aminoácidos para as espécies estudadas foi 6,7mg.g⁻¹ (*C. baccatum*), 8,2mg.g⁻¹ (*C. chinense*), 8,1mg.g⁻¹ (*C. annuum*) e 4,1mg.g⁻¹ para o acesso de *C. frutescens*.

A frutose foi o açúcar mais abundante nos acessos estudados, representando em média 49% do total de açúcares para a espécie *C. baccatum*, 55% para *C. chinense*, 53% *C. annuum* e 44% no acesso de *C. frutescens*. O teor mínimo e máximo de frutose variou entre (55,8 – 85,4mg.g⁻¹), (40,0 – 93,3mg.g⁻¹), (28,6 – 84,9mg.g⁻¹) e (27,8mg.g⁻¹), respectivamente para as referidas espécies (Figura 10 b).

Açúcares e ácidos orgânicos são compostos importantes nas características de sabor e o valor nutricional em frutas (LUGING et al., 1994). Navarro et al. (2006) relataram diminuição de sacarose até teores indetectáveis em frutos de *Capsicum* conforme o estágio de maturação. Para determinação do perfil metabólico nos 61 acessos, foram utilizados apenas frutos totalmente maduros, assim já eram esperadas baixas concentração de sacarose nestes acessos, em média a sacarose representou entre 1 e 7% do total de açúcares. A média de mono e dissacarídeos em *Capsicum* spp. foi de 106,9mg.g⁻¹.

O ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, também conhecido como ácido cítrico foi o ácido orgânico predominante para todos os acessos das espécies *C. chinense* e *C. annuum* e sua concentração variou de 3,65mg.g⁻¹ até 8,31mg.g⁻¹ representando em média 56% do total de ácidos orgânicos para a espécie *C. chinense*, para *C. annuum* esses valores foram de 4,38mg.g⁻¹ até 11,32mg.g⁻¹, representando em média 66% do total de ácidos orgânicos para este espécie. O acesso P82 (*C. frutescens*) apresentou 8,3mg.g⁻¹ de ácido succínico (ácido butanodióico) equivalente a 77% do total de ácidos orgânicos observados para esse acesso, o mesmo composto foi predominante para os acessos P27 (2,41mg.g⁻¹), P71 (2,85mg.g⁻¹), P108 (1,93mg.g⁻¹) e P197 (1,59mg.g⁻¹) da espécie *C. baccatum*. Os demais acessos dessa espécie também tiveram o ácido cítrico como de maior teor, atingindo valores até 10,18mg.g⁻¹ (P280).

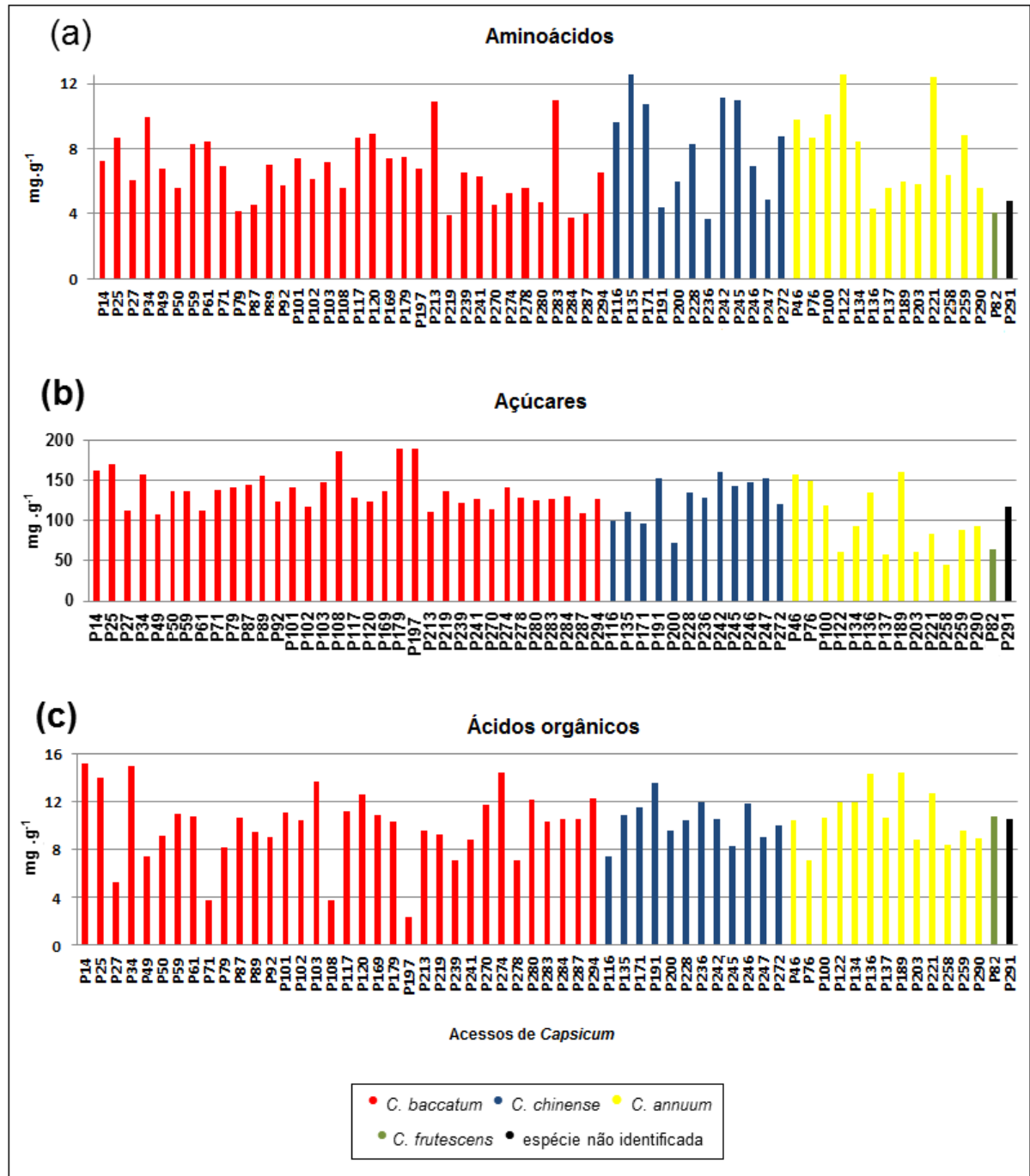


Figura 10 – Representação gráfica do teor de metabólitos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) em 61 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.) do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. (a) total de aminoácidos, (b) total de açúcares e (c) total de ácidos orgânicos

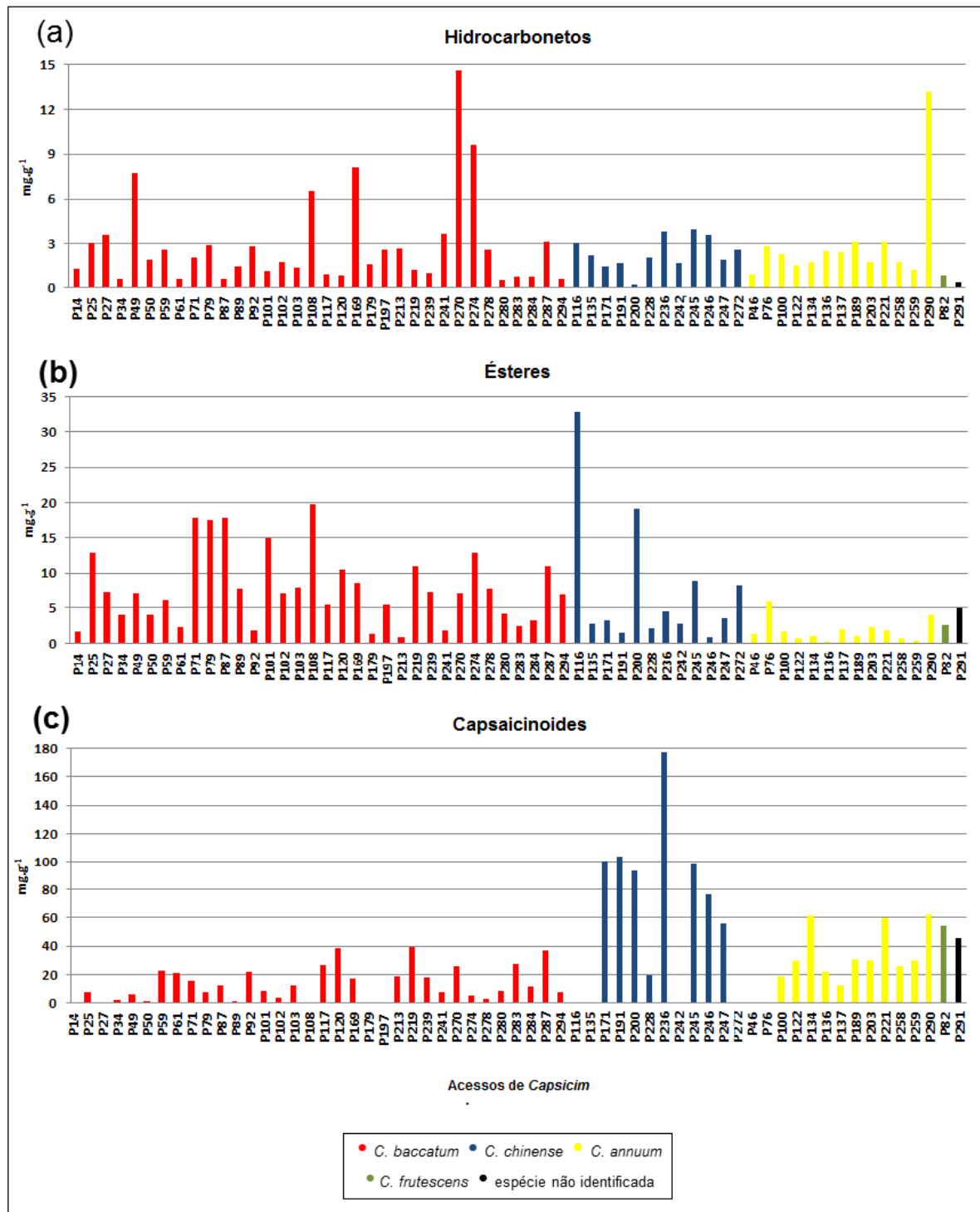


Figura 11 - Representação gráfica do teor de metabólitos (mg.g^{-1} de massa seca) em 61 acessos de pimentas (*Capsicum* spp.) do BAG da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. (a) hidrocarbonetos, (b) ésteres e (c) capsaicinoides

Hidrocarbonetos apresentaram teores entre $0,2$ e $14,6\text{mg.g}^{-1}$ ms, as maiores concentrações foram encontrados para os acessos P49, P108, P169, P270 e P274 (*C. baccatum*) e P290 (*C. annuum*) e as menores concentrações para os acessos P 200 (*C. chinense*), P291 (*C. sp.*), P280, P283, P284, P161 e P34 (*C. baccatum*).

O total de ésteres na Fração polar B variou entre 0,4 e 32,8mg.g⁻¹ (média de 6,28mg.g⁻¹ de fruto em massa seca), de maneira geral, o composto mais abundante foi 1,3-dihidroxiopropan-2-il hexadecanoato, e representou em média 30% para os acessos em que estava presente, seus teores variaram de no mínimo 0.32mg.g⁻¹ (P134) até o máximo de 6,57mg.g⁻¹ (P116).

Os compostos responsáveis pela pungência dos frutos de *Capsicum* são os capsaicinoides, esses alcaloides são sintetizados a partir da transcrição e tradução do gene *Pun1* que controla a rota biossintética da capsaicina. Nessa rota, a aciltransferase é responsável pela transferência de um radical acila para o radical vanilil-amida resultando na porção aromática da estrutura da capsaicina e posteriormente há a adição de um ácido graxo (Figura 3) (MAZOUREK et al., 2009). Mutações e perda da função no gene resulta na produção de capsaicinoides em teores abaixo do limiar de percepção ou ausência de pungência por não produção desses compostos, o que ocorre na maioria das pimentas doces e pimentões (MAZOUREK et al., 2009; WAHYUMI et al., 2013). Esse fator pode estar relacionado aos resultados observados nos acessos P14, P27, P50, P89, P108, P179, P197 e P278 (*C. baccatum*), P116, P135, P242 e P272 (*C. chinense*) e P46 e P76 (*C. annuum*) conforme mostra a figura 11 (c).

Quando presente, a capsaicina foi o capsaicinoide predominante na maioria dos acessos, e representou em média 59% do total de capsaicinoides entre os acessos. Juntas a capsaicina e a dihidrocapsaicina representaram em média 89% do total de capsaicinoides entre os acessos, estes valores estão de acordo com a literatura que estima que 90% dos capsaicinoides são de capsaicina e dihidrocapsaicina (NWOKEM et al., 2010). Seus teores variaram entre 0,17mg.g⁻¹ e 0,06mg.g⁻¹ (P116) e 140,40mg.g⁻¹ e 31,80mg.g⁻¹ (P236) para capsaicina e dihidrocapsaicina, respectivamente (Figura 11 c).

Acunha (2014) também avaliou o teor de capsaicinoides nos acessos do BAG de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, dos quais 34 estão em comum com o presente estudo. Os acessos que se destacaram nos teores de capsaicina e dihidrocapsaicina para a autora foram P236 e P246 (*C. chinense*), condizentes com os resultados observados para teor de capsaicinoides totais na figura 11 c. No entanto, os acessos P171, P191, P200, P245, P247 (*C. chinense*) que também se destacaram no presente estudo por apresentarem maiores teores compostos capsaicinoides, não foram avaliados no trabalho de Acunha (2014). Ainda

considerando o trabalho desenvolvido por Acunha (2014), menores teores desses compostos foram observados para os acessos P14, P27, P34, P89, P169 e P197 (*C. baccatum*), P46 e P76 (*C. annuum*) e P116 (*C. chinense*), em conformidade aos resultados obtidos na fração polar B, nesse estudo (Figura 11 c). Entre as espécies, observou-se maior concentração de capsaicinoides nos frutos de *Capsicum chinense*, seguido pela espécie *C. frutescens* (tabela 2), no trabalho de Acunha (2014) a espécie *C. chinense* também predominou quanto ao teor de capsaicinoides.

Nas tabelas 3 e 4 estão descritos 90 compostos das frações polares A e B obtidas de frutos de *Capsicum*. A confirmação dos compostos foi feita por comparação do espectro de massas da amostra com a biblioteca NIST 2011. Também estão disponíveis os índices de tempo de retenção (IK) calculado automaticamente pelo software a partir da série homologa de ésteres metílicos de ácidos graxos (C8-C24). Índice de tempo de retenção ou índice de Kovats é um modelo matemático utilizado para converter o tempo de retenção dos compostos à variáveis independentes da programação no equipamento (RICKWOOD e HAMES, 1993).

Para a obtenção de dados em cromatografia gasosa há necessidade de estabilidade térmica a injeção no equipamento e volatilidade dos compostos. Etapas com reações como a silicacção proporcionam a estabilidade térmica para os compostos por adição de um radical trimetilsil como substituinte de hidroxilas, aminas e tiois, também podem ser citadas etapas de acilação, oximação e alquilação (RICKWOOD e HAMES, 1993). Autores relatam que a etapa de oximação é uma maneira de evitar formação de isômeros de açúcares e consequente formação de mais de um pico para cada composto (ZAIKIN e HALKET, 2003). Isômeros são compostos que apresentam o mesmo conjunto de átomos, mas arranjados de maneira diferente e a diluição de açúcares em água propicia a formação de até 4 isômeros (HALKET e ZAIKIN, 2003; ZAIKIN e HALKET, 2003;). Como utilizou-se água na etapa de fracionamento do extrato (fração polar A e B), houve a formação de um meio propício a isomerização e com isso as repetições de compostos observadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição dos principais metabólitos da fração polar A encontrados por CG-EM em 61 acessos de frutos de *Capsicum*

Nº	Nome do composto	Classe	Tempo de retenção	Massa molecular derivatizada	Íons de referencia*	Índice de tempo de retenção**
1	Alanina	Aminoácido	4.55	233	73 (46); 116 (100); 117 (12); 147 (15); M+. 233 (<1)	780
2	Valina	Aminoácido	5.80	261	73 (57); 144 (100); 145 (12); 218 (18); M+. 261 (<1)	901
3	Leucina	Aminoácido	6.37	275	73 (38); 102 (10); 158 (100); 159 (14); M+. 275 (<1)	956
4	Isoleucina	Aminoácido	6.59	275	73 (53); 158 (100); 159 (14); 218 (19); M+. 275(<1)	977
5	Prolina	Aminoácido	6.62	259	73 (40); 142 (100); 143 (13); 147 (6); M+. 259 (<1)	981
6	Glicina	Aminoácido	6.71	291	73 (48); 86 (21); 147 (26); 174 (100);	989
7	Serina	Aminoácido	7.23	321	73 (94); 100 (25); 204 (100); 218 (61);	1046
8	Treonina	Aminoácido	7.49	335	73 (100); 117 (44); 218 (51); 219 (44);	1075
9	Norvalina	Aminoácido	7.91	273	73 (21); 82 (80); 172 (100); 173 (15); M+. 273 (<1)	1123
10	Ácido butanodióico	Ácido orgânico	8.36	350	73 (100); 147 (48); 233 (17); 245 (9); M+. 350 (<1)	1174
11	Ácido L-aspártico	Aminoácido	8.63	349	73 (98); 100 (31); 232 (100); 233 (21); M+. 349 (<1)	1202
12	Prolina	Aminoácido	8.66	273	73 (55); 147 (15); 156 (100); 157 (12); M+. 273 (<1)	1209
13	Ácido butanóico	Ácido orgânico	8.70	319	73 (51); 147 (37); 174 (100); 304 (28); M+. 319 (<1)	1214
14	Ácido Glutâmico	Aminoácido	9.41	363	73 (69); 128 (39); 147 (22); 246 (100); M+. 363 (3,28)	1305

15	Fenilalanina	Aminoácido	9.50	309	73 (100); 100 (292); 192 (69); 218 (94); M+. 309 (<1)	1317
16	Asparagina (isômero 1)	Aminoácido	9.53	420	73 (100); 147 (22); 188 (66); 216 (28); M+. 420 (<1)	132
17	Xilose	Açúcar	9.79	463	73 (100); 103 (86); 217 (55); 307 (26); M+. 463 (<1)	1353
18	Asparagina (Isômero 2)	Aminoácido	9.83	348	73 (100); 116 (70); 132 (31); 231 (34); M+. 348 (<1)	1359
19	Xilitol	Açúcar	10.30	512	73 (100); 103 (45); 147 (44); 73 (100);	1421
20	Meso-Eritritol	Açúcar	10.43	410	73 (100); 147 (67); 205(41); 217 (39);	144
21	Glutamina	Aminoácido	10.58	362	73 (94); 155 (38); 156 (100); 245 (23); M+. 362 (1,32)	146
22	Ácido 1-ciclohexeno- 1-carboxílico	Ácido orgânico	10.83	462	73 (67); 147 (21); 204 (100); 205 (20); M+. 462 (1,13)	1496
23	Frutose (isômero 1)	Açúcar	10.88	540	73 (100); 147 (23); 217 (69); 437 (18);	1503
24	Ácido 1,2,3- propanotricarboxílico	Ácido orgânico	10.95	480	73 (100); 147 (56); 273 (94); 347 (20); M+. 480 (<1)	1513
25	Frutose (isômero 2)	Açúcar	11.00	540	73 (100); 147 (30); 204 (73); 217 (26); M+. 540 (<1)	1521
26	NI	Ácido orgânico	11.28	-	73 (99); 147 (34); 255 (42); 345 (100);	156
27	Frutose (isômero 3)	Açúcar	11.38	569	73 (100); 103 (98); 217 (70); 307 (42); M+. 569 (<1)	1574
28	Frutose (isômero 4)	Açúcar	11.44	569	73 (100); 103 (87); 217 (70); 307 (42); M+. 569 (<1)	1584
29	D-Allose (isômero 1)	Açúcar	11.51	569	73 (100); 147 (40); 205 (49); 319 (51); M+. 569 (<1)	1594
30	Talose (isômero 1)	Açúcar	11.56	569	73 (100); 147 (48); 205 (59); 319 (64);	16

31	Talose (isômero 2)	Açúcar	11.68	569	73 (100); 147 (38); 205 (44); 319 (52);	162
32	Tirosina	Aminoácidos	11.74	397	73 (42); 218 (100); 219 (17); 280 (13); M+. 397 (<1)	1629
33	Glucitol	Açúcar	11.76	614	73 (88); 205 (78); 217 (65); 319 (100);	1632
34	3- α -Manobiose	Açúcar	11.92	918	73 (100); 147 (21); 217 (66); 361 (240)	1657
35	Maltose	Açúcar	12.06	947	73 (100); 147 (19); 204 (28); 217 (68)	1679
36	D-Glicose	Açúcar	12.39	540	73 (99); 204 (100); 205 (23); 220 (22);	173
37	D-Allose (isômero 2)	Açúcar	13.09	627	73 (100); 147 (40); 205 (51); 319 (81);	1844
38	D-(+)-Manose	Açúcar	13.12	627	73 (100); 103 (36); 205 (38); 319 (58);	1849
39	Ácido D-Glicurônico	Ácido orgânico	14.41	554	73 (100); 147 (31); 204 (60); 217 (64); M+. 554 (<1)	2075
40	Sacarose	Açúcar	15.87	918	73 (60); 217 (31); 661 (100); 662 (33);	2357
41	Lactose (isômero 1)	Açúcar	16.42	918	73 (68); 204 (100); 205 (20); 217 (17);	2469
42	Galactinol	Açúcar	17.55	990	73 (44); 191 (24); 204 (100); 217 (30);	2695
43	Melibiose	Açúcar	16.71	918	73 (74); 204 (100); 205 (22); 217 (46);	2527
44	β -Gentiobiose	Açúcar	16.76	947	73 (69); 204 (100); 205 (21); 361 (39);	2536
45	Lactose (isômero 2)	Açúcar	16.77	918	73 (67); 204 (100); 205 (20); 217 (15);	2538

Nº número. * biblioteca de espectro de massas NIST 2011, M⁺ íon molecular. ** FAMES C8-C24 (ésteres metílicos de ácidos graxos), NI não identificado.

Tabela 4 – Descrição dos principais metabólitos da fração polar B encontrados por CG-EM em 61 acessos de frutos de *Capsicum*

Nº	Identificação do compostos	Tempo de retenção	Massa molecular	Íons de referência*	Índice de tempo de retenção**
1	Hidrocarboneto	6.428	-	70 (16); 71 (100); 85 (65); 99 (14);	956
2	Ácido graxo	6.933	-	71 (43); 73 (100); 87 (24); 129 (62);	1009
3	Hidrocarboneto	7.631	-	122 (18); 137 (100); 138 (11); 167 (15);	1088
4	Hidrocarboneto	8.068	-	70 (21); 71 (100); 85 (61); 89 (19);	1138
5	Hidrocarboneto	8.364	-	71 (100); 85 (78); 99 (23); 113 (17);	1172
6	Álcool	8.538	-	74 (7); 163 (6); 191 (100); 192 (14);	1192
7	Hidrocarboneto	8.731	-	71 (100); 85 (77); 99 (23); 113 (16);	1216
8	Hidrocarboneto	10.150	-	71 (32); 74 (100); 85 (18); 87 (61);	1398
9	Ácido graxo	10.397	-	71 (35); 73 (100); 129 (52); 85 (27);	1433
10	Hidrocarboneto	10.675	-	71 (100); 83 (14); 85 (71); 99 (22);	1473
11	Hidrocarboneto	10.785	-	81 (65); 83 (91); 84 (66); 97 (100);	1489
12	Ácido graxo	10.895	-	71 (53); 73 (100); 83 (35); 129 (47);	1504
13	Hidrocarboneto	11.047	-	70 (64); 73 (56); 83 (100); 97 (72);	1526

14	Hidrocarboneto	11.370	-	71 (100); 85 (69); 99 (24); 113 (17);	1572
15	Éster	11.429	-	74 (96); 83 (100); 84 (80); 87 (72);	1581
16	Éster	11.552	-	71 (20); 74 (100); 75 (19); 87 (70);	1598
17	Ácido graxo	11.664	-	70 (56); 83 (100); 84 (70); 97 (74);	1615
18	Ácido graxo	11.792	-	71 (46); 73 (100); 85 (32); 129 (48);	1636
19	9,10-Antracenediona	12.102	208	76 (47); 151 (33); 152 (66); 180 (85); M+. 208 (100)	1685
20	Hidrocarboneto	12.576	-	70 (45); 83 (100); 97 (87); 111 (43);	1758
21	Éster	12.660	-	81 (100); 82 (58); 95 (62); 96 (38);	1772
22	Éster	12.688	-	74 (100); 83 (98); 84 (89); 97 (81);	1777
23	Ácido graxo	12.989	-	81 (84); 82 (67); 83 (100); 97 (73);	1826
24	Hidrocarboneto	13.077	-	83 (90); 84 (87); 88 (100); 97 (91);	1841
25	Hidrocarboneto	13.127	-	79 (100); 81 (43); 93 (47); 95 (52);	1849
26	Hidrocarboneto	13.277	-	72 (73); 73 (100); 86 (43); 114 (51);	1875
27	Éster	13.509	-	84 (45); 98 (91); 104 (100); 117 (65);	1915
28	Hidrocarboneto	13.646	-	72 (73); 73 (100); 86 (43); 114 (53);	1939

29	Álcool	13.778	-	82 (43); 83 (100); 97 (90); 111 (47);	1960
30	Éster	14.402	-	70 (34); 71 (29); 112 (25); 129 (100);	2073
31	Éster	14.640	-	86 (41); 98 (93); 104 (100); 117 (64);	2117
32	Éster	15.016	-	74 (74); 84 (73); 98 (100); 239 (57);	2187
33	Nonivamida (Capsaicinoide)	15.137	293	137 (100); 138 (12); 151 (16); 195 (14); M+. 293 (19)	2210
34	Capsaicina (Capsaicinoide)	15.360	305	122 (7); 137 (100); 138 (12); 152 (11); M+. 305 (6,6)	2255
35	Dihidrocapsaicina (Capsaicinoide)	15.473	307	137 (100); 138 (14); 151 (16); 195 (15); M+. 307 (17)	2278
36	Hidrocarboneto	15.942	-	81 (100); 82 (58); 95 (64); 98 (53);	2372
37	Éster	16.050	-	71 (42); 74 (69); 84 (69); 98 (100);	2393
38	Hidrocarboneto	16.375	-	72 (100); 83 (24); 97 (17); 126 (19);	2459
39	γ -Tocoferol (Fitosterol)	17.657	416	150 (23); 151 (100); 191 (23); 417 (25); M+. 416 (81)	2716
40	α -Tocopherol (Fitosterol)	18.013	430	164 (39); 165 (100); 205 (11); 431 (25); M+. 430 (76)	2787
41	Campesterol (Fitosterol)	18.592	400	81 (94); 95 (92); 105 (88); 107 (97); M+. 400 (100)	2903
42	Estigmasterol (Fitosterol)	18.744	412	81 (81); 83 (100); 97 (53); 133 (54); M+. 412 (50)	2934
43	γ -Sitosterol (Fitosterol)	19.052	414	81 (97); 95 (90); 105 (82); 107 (100); M+. 414 (97)	2996

44	(3 β)-9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol (Fitosterol)	19.512	426	81 (74); 95 (100); 109 (83); 119 (64); M+. 426 (15)	3088
----	---	--------	-----	--	------

Nº número. * biblioteca de espectro de massas NIST 2011, M⁺ íon molecular. ** FAMES C8-C24 (ésteres metílicos de ácidos graxos).

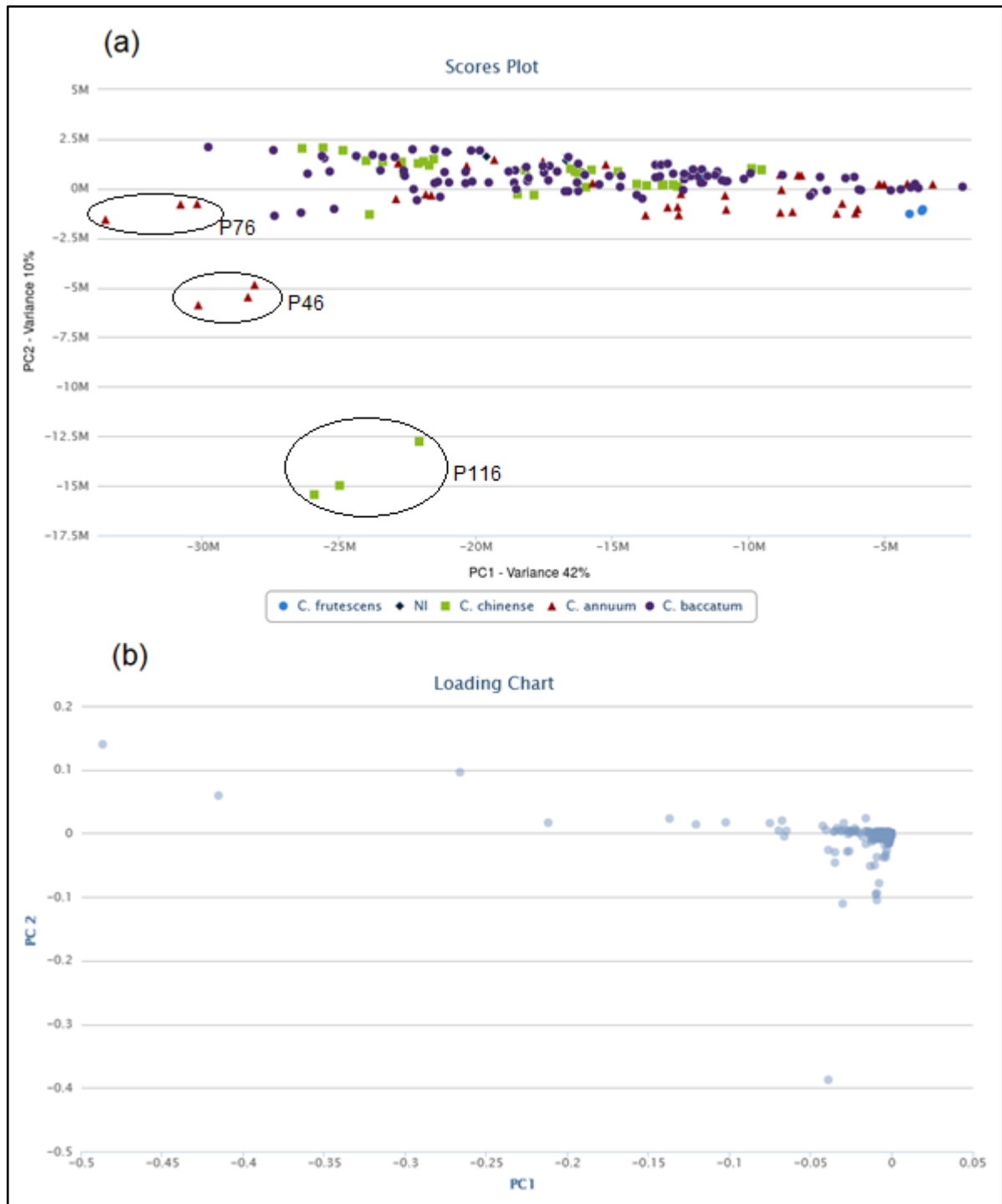


Figura 12 - Plotagem dos Scores (a) e Loadings (b) da análise de componentes principais na Fração polar A (metanol e água) em 4 espécies de *Capsicum* oriundas do BAG Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. PC (componentes principais)

A Análise de Componentes Principais revelou a similaridade metabólica de 61 acessos de *Capsicum* com base compostos das frações polares A e B (Figuras 12 e 15). Na amostragem da fração polar A (Figura 12), os dois primeiros componentes

principais (PC), representaram juntos a variação total de 52%. O PC 1 apresentou o maior valor e representou 42% da variabilidade total no conjunto de dados. Os acessos que mais se afastaram do grupo principal foram P116 (*C. chinense*), P46 e P76 (*C. annuum*). O pico determinante para a separação do acesso P116 foi o de tempo de retenção de 15,9 minutos sua contribuição foi de 1,4% (Figura 12). Esse composto foi identificado como sacarose ou no caso da estrutura derivatizada 1,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- β -D-frutofuranosil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- α -D-glicopiranosideo, com 97% de similaridade com o padrão de fragmentação da biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) 2011 e os principais íons de referência foram 73 (51%); 217 (29%); 361 (100%); M^+ 918 (Figura 13). Foi possível observar que quanto mais próximo a 2,5M no eixo do componente principal 2 (Figura 12) menor foi a intensidade de área para este composto. Para os acessos P46 e P76 o composto derivatizado da frutose apresentou-se como o mais determinante, identificado como 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-O-metiloxima D-frutose, com tempo de retenção de 11,4 minutos, com similaridade com o padrão de fragmentação da biblioteca NIST 2011 de 94%. O perfil de fragmentação para este composto foi 73 (99%); 103 (100%); 217 (85%); M^+ 569 (<1%) (Figura 14). Menores intensidades de área foram encontradas para esse composto quando mais próximo a -5M no eixo do componente principal 1 (Figura 12).

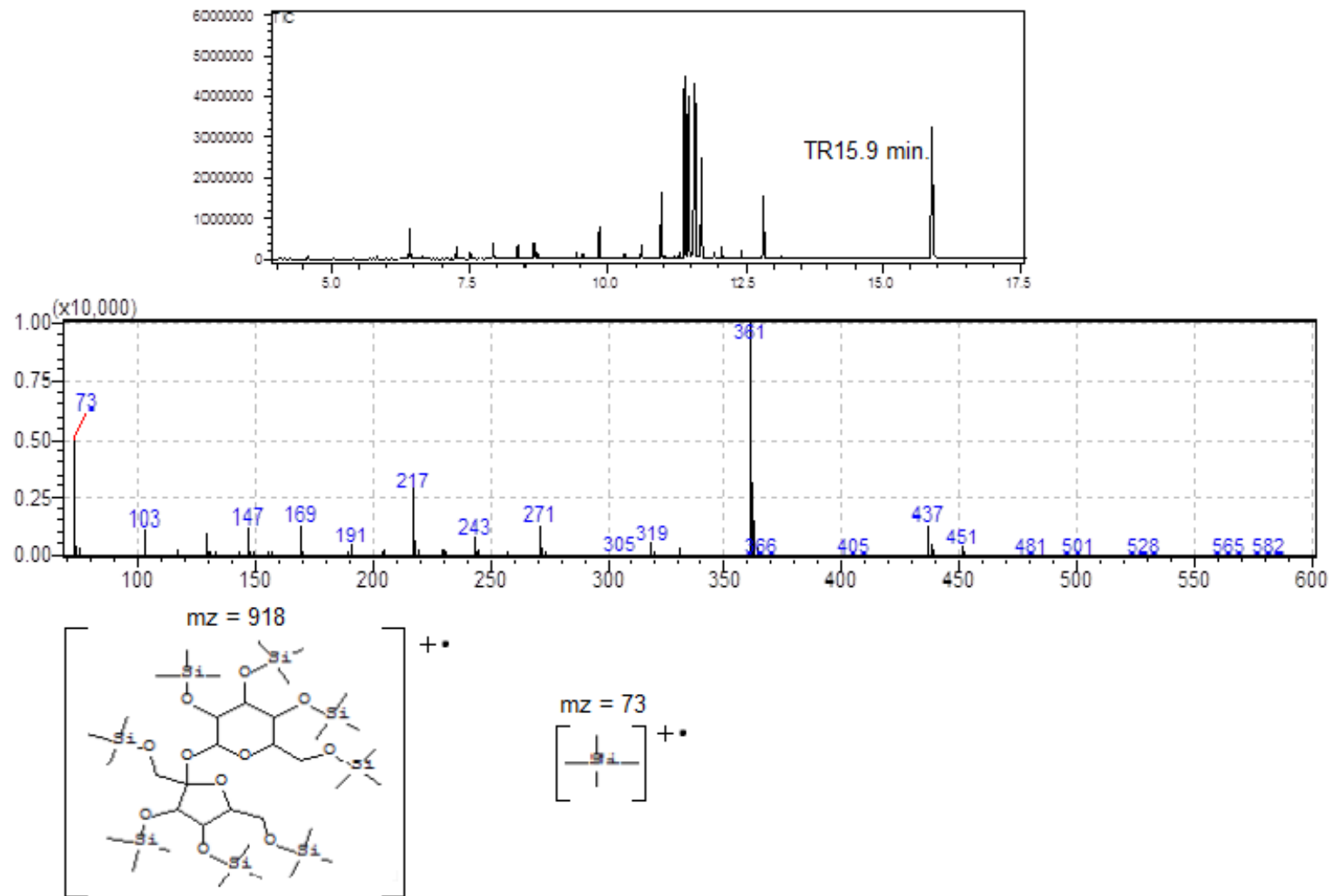


Figura 13 - Perfil metabólico por CG-EM do extrato da fração polar A do acesso P116 (*C. chinense*)

De cima para baixo: Cromatograma de íons totais, perfil de fragmentação do composto derivatizado da Sacarose e fórmula estrutural do íon molecular e seus principais fragmentos.

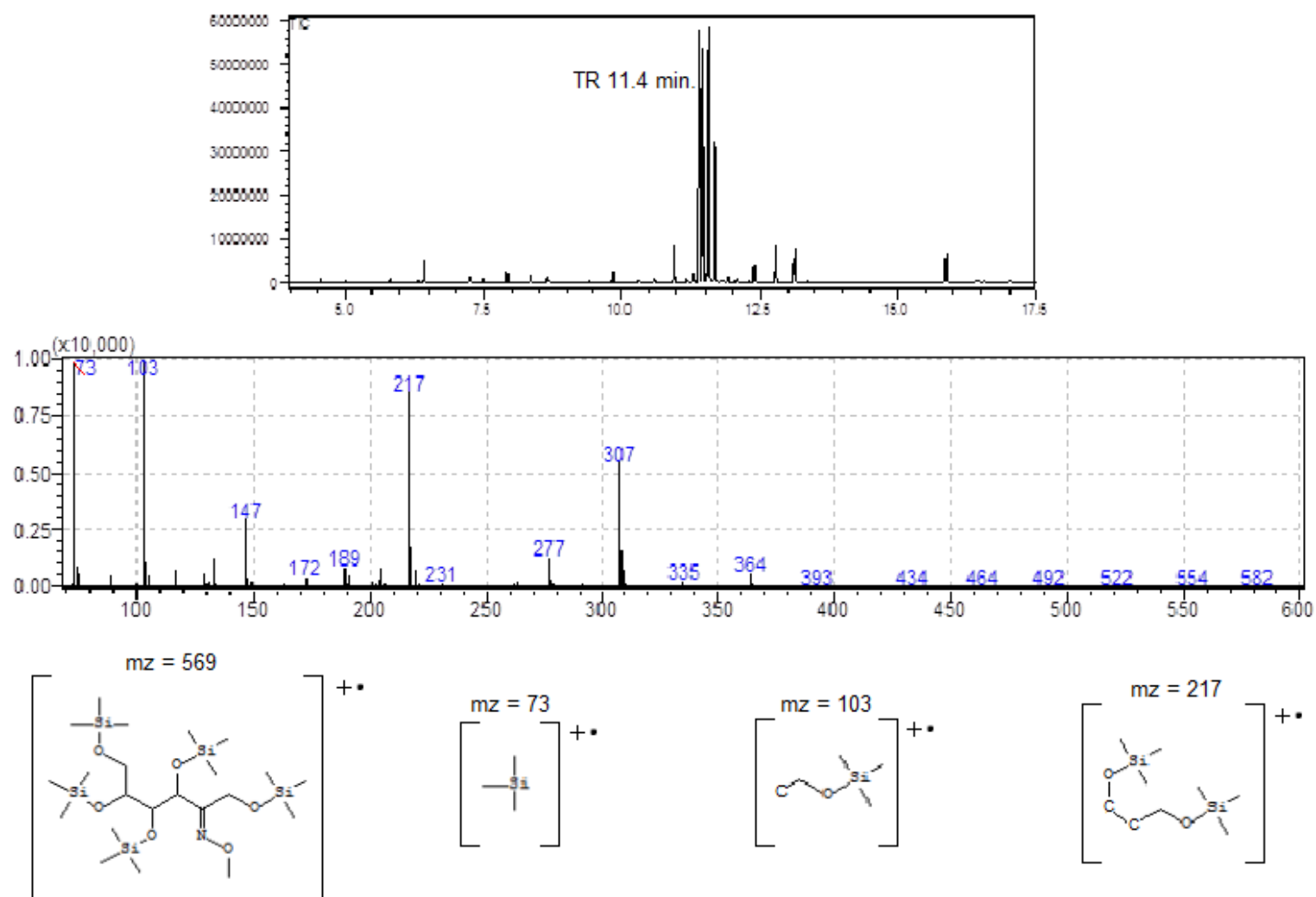


Figura 14 – Perfil metabólico por CG-EM do extrato da fração polar A do acesso P76 (*C. annuum*)

De cima para baixo: Cromatograma de íons totais, perfil de fragmentação do composto derivatizado de Frutose e fórmula estrutural do íon molecular e seus principais fragmentos.

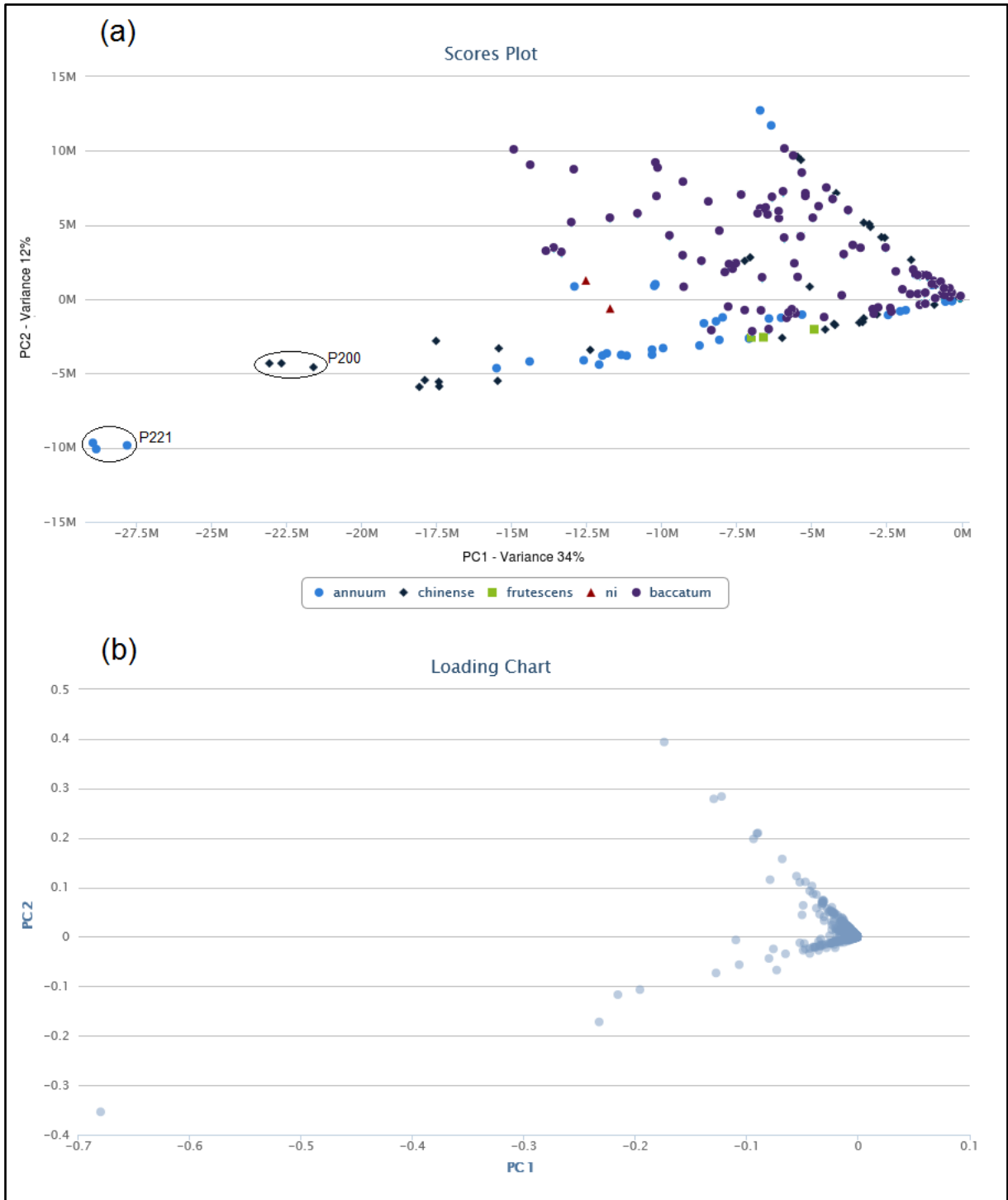


Figura 15 - Plotagem dos Scores (a) e Loadings (b) da análise de componentes principais na fração polar B (clorofórmio, a partir da extração metanólica) em 4 espécies de *Capsicum* oriundas do BAG Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. PC (componentes principais)

Na amostragem da fração polar B (Figura 15), os dois primeiros componentes principais (PC), representaram juntos a variação total de 46%. O PC 1 apresentou o maior valor e representou 34% da variabilidade total no conjunto de dados. Os acessos que mais se afastaram do grupo principal foram P221 (*C. annuum*) e P200

(*C. chinense*). O pico determinante para a separação desses acessos foi o de tempo de retenção de 15,5 minutos sua contribuição foi de 28,5%. Esse composto foi identificado como dihidrocapsaicina com 91% de similaridade com o padrão de fragmentação da biblioteca NIST 2011 e os principais íons de referência foram 137 (100%); 151 (22%); 195 (19%); M^+ 307 (23%) (figura 16). Foi possível observar que quanto mais próximo a 0M no eixo do componente principal 1 (figura 15) menor foi a intensidade de área para este composto.

A análise de componentes principais, que considerou a composição global dos metabólitos polares das frações A e B não resultou na separação de acessos de diferentes espécies em grupos, indicando que para esses extratos a variabilidade metabólica não influencia na especiação do gênero *Capsicum*. No entanto, Wahyumi et al. (2013) avaliavam o perfil metabólico em 32 acessos de *Capsicum* das mesmas espécies estudadas neste trabalho e observaram para metabólitos semipolares e para voláteis há influência dos compostos na distinção das espécies.

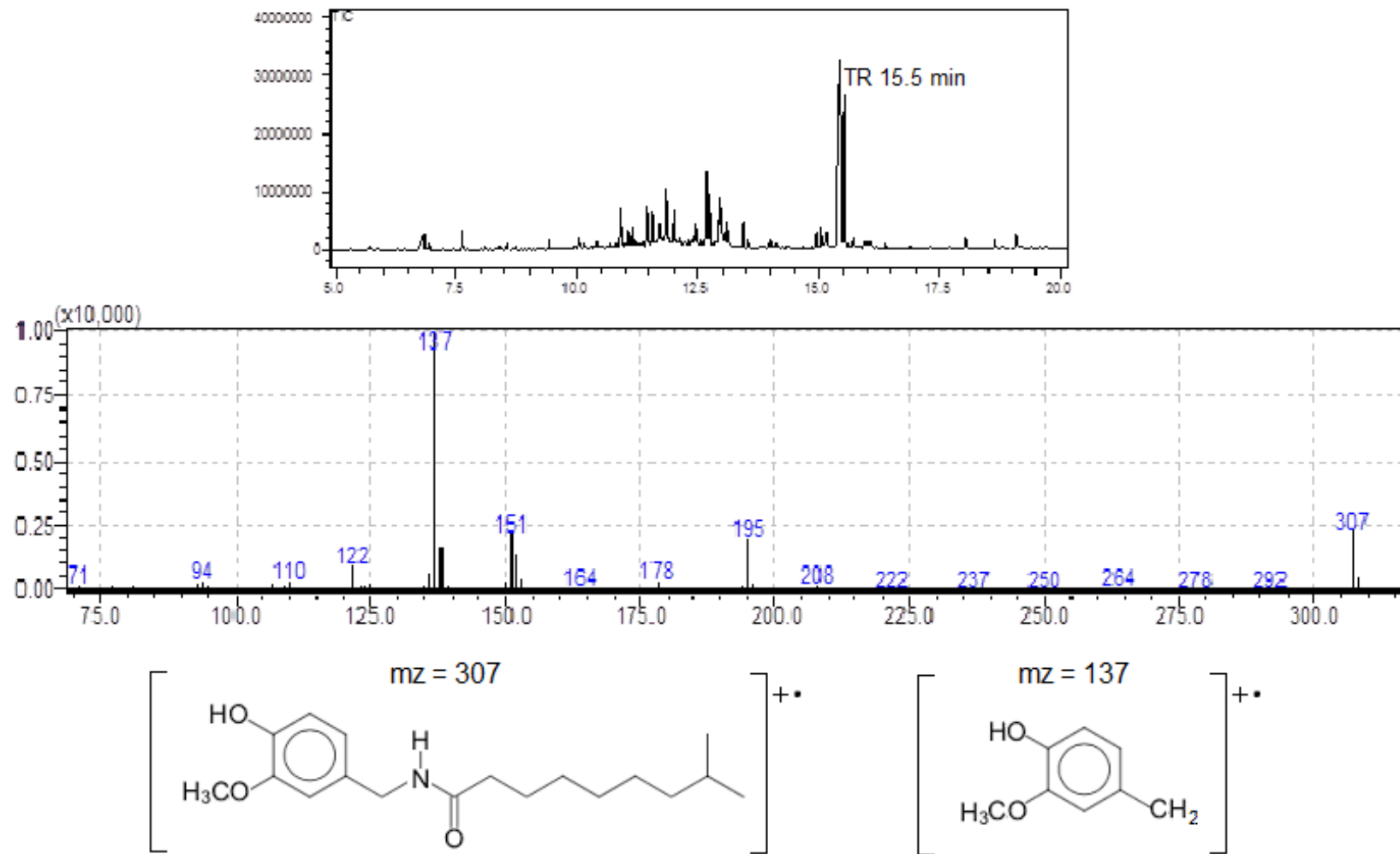


Figura 16 - Perfil metabólico por CG-EM do Extrato da fração polar B do acesso P221 (*C. annuum*)

De cima para baixo: Cromatograma de íons totais, perfil de fragmentação do composto Dihidrocapsaicina e fórmula estrutural do íon molecular e seus principais fragmentos.

6 Considerações finais

Através da estratégia metabolômica de análise realizada por CG-EM nas frações polares A e B, foi possível evidenciar a variabilidade de metabólitos entre os diferentes acessos de *Capsicum* nas espécies estudadas. Esses resultados contribuem ao Banco Ativo de Germoplasma com informações ainda não elucidadas para esses acessos, como o perfil de aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, ésteres e hidrocarbonetos.

Na fração polar A, foram observados os teores totais de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. O aminoácido L-asparagina predominou em 46 acessos dos 61 acessos estudados. A frutose representou em média mais de 50% do total de açúcares simples. O ácido cítrico foi o principal ácido orgânico em frutos de *Capsicum*.

Na fração polar B, identificou-se compostos pertencentes às classes de hidrocarbonetos, ésteres e capsaicinoides. A capsaicina e dihidrocapsaicina representaram juntas 89% do total de capsaicinoides nos acessos avaliados, maiores teores de capsaicinoides totais foram observados para o acesso P236 (*C. chinense*). Os acessos P27 e P179 (*C. baccatum*), P135 (*C. chinense*) e P46 (*C. annuum*) não apresentaram capsaicinoides.

A análise de metabolômica por CG-EM, nos extratos estudados, não discriminou as espécies de *Capsicum*, no entanto *outliers* foram observados. Maiores teores de sacarose permitiram a diferenciação do acesso P116 (*C. chinense*) na análise de componentes principais, o mesmo foi observado para os acessos P46 e P76 (*C. annuum*) devido a frutose. P221 (*C. annuum*) e P200 (*C. chinense*) distinguiram-se do grupo devido a maiores teores de dihidrocapsaicina.

Referências bibliográficas

- ACUNHA, T.S. **Variabilidade metabólica em pimentas (*Capsicum* spp.): destaque para capsaicinoides por CLAE/FL/EM/EM.** Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, 2013. 72 p.
- ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; ASOKKUMAR, S.; NAVEENKUMAR, C.; RAGHUNANDHAKUMAR, S.; DEVAKI, T. Capsaicin inhibits benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in an in vivo mouse model. **Inflammation Research**, v. 61, p. 1169-1175. 2012.
- ANDREWS, J. **Peppers: the domesticated Capsicums.** Austin: University of Texas Press, 1984. 170 p.
- AZA-GONZÁLEZ, C.; NÚÑEZ-PALENIUS, H.G.; OCHOA-ALEJO, N. Molecular biology of Chili pepper anthocyanin biosynthesis. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56(1), p. 93-98. 2012.
- BARBERO, G.F.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; PALMA, M.; MACIAS, F.A.; BARROSO, C.G. Application of Hansch's Model to Capsaicinoids and Capsinoids: A Study Using the Quantitative Structure-Activity Relationship. A Novel Method for the Synthesis of Capsinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(6): p. 3342-3349. 2010.
- BARBERO, G.F.; RUIZ, A.G.; LIAZID, A.; PALMA, M.; VERA, J.C.; BARROSO, C.G. Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annum* L.). **Food Chemistry**, v. 153, p. 200-206. 2014.
- BENNET-CLARK, T.A. The role of the organic acids in plant metabolism. Part I, **New Phytologist**, v. 32, p. 37. 1993.
- BENNETT, D.J.; KIRBY, G.W. Constitution and biosynthesis of capsaicin. **Journal of the Chemical Society C**, v. 4, p. 442-446. 1968.
- BERNARD, S.M.; HABASH, D.Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v. 182, p. 608-620. 2009.
- BINO, R.J.; HALL, R.D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B.J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M.H.; TRETHERWEY, H.N.; LANGE, B.M.; WURTELE, E.S.; SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9(9), p. 418-425. 2004.
- BOLTON, M.D. Primary metabolism and plant defense – fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 487-497. 2009.
- BOROVSKY, Y.; OREN-SHAMIR, R.; OVADIA, R.; DE JONG, W.; PARAN I. The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to Anthocyanin2 of Petunia. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109(1), p. 23-29. 2004.

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

BRATT, K. **Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxidative stress**. PhD Thesis, University Uppsala, 2000.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 179-208. 2005.

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, p. 560-64. 1998.

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

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 39-53. 2008.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Química Nova**, v. 32(4), p. 1021-1030. 2009.

CEVALLOS-CEVALLOS, J.M.; REYES-DE-CORCUERAA, J.I.; ETXEBERRIAA, E.; DANYLUKA, M.D; RODRICK; G.E. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 557-566. 2009.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, v. 31(3), p. 623-636. 2008.

COLLERA-ZUNIGA, O.; JIMNEZ, F. G.; GORDILLO, R. M.; Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annum* L. **Food Chemistry**, v. 90, p. 109-114. 2005.

CONSTANT, H.L.; CORDELL, G.A.; WEST, D.P. Nonivamide, a constituent of *Capsicum* oleoresin. **Journal of Natural Products**, v. 59(4), p. 425-426. 1996.

DAMBROS, J.I. **Estabilidade de compostos potencialmente bioativos e alterações de qualidade em frutos e produtos de pimenta (*Capsicum* spp.)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, 2014. 114 p.

DE VOS, R.C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J.J.; BINO, R.J.; HALL, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, p. 778-791. 2007.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5(1), p. 33-40. 2004.

- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Review in Food Science Nutrition**, v. 40, p. 173-289. 2000.
- DE-SA-JUNIOR, P.L.; PASQUALOTO, K.F.; FERREIRA, A.K.; TAVARES, M.T.; DAMIAO, M.C.; DE AZEVEDO, R.A.; CAMARA, D.A.; PEREIRA, A.; DE SOUZA, D.M.; PARISE FILHO, R. RPF101, a new capsaicin-like analogue, disrupts the microtubule network accompanied by arrest in the G2/M phase, inducing apoptosis and mitotic catastrophe in the MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, p. 385-398. 2013.
- DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, J.A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79-106. 2000.
- DUTTA, D.; CHAUDHURI, U., R.; CHAKRABORTY, R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.4. n.13, p.1510-1520. 2004.
- ESTRADA, B.; BERNAL, M.A.; DIAZ, J.; POMAR, F.; MERINO, F. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum* L. in relation to fruiting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(5), p. 1188-1191. 2002.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division). Production/ crops: Chillies and peppers. Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Access in: 01/04/2016.
- FERREIRA, L.T.; ALMEIDA, I.L.; BÔAS, H.D.C.V. **Embrapa apresenta cultivares de pimenta em Encontro Nacional do Agronegócio**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa. Disponível em: http://spm.embrapa.br/noticias/noticia_completa/155/. Acesso em: 24/01/2016.
- FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265. 2004.
- GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 334-361. 1998.
- GARCES-CLAVER, A.; GIL-ORTEGA, R.; ALVAREZ-FERNANDEZ, A.; ARNEDO-ANDRES, M.S. Inheritance of capsaicin and dihydrocapsaicin, determined by HPLC-ESI/MS, in an intraspecific cross of *Capsicum annum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 (17), p. 6951-6957. 2007.
- GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794-802. 2013.
- GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTROM, A.; SJOSTROM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas

chromatography/ mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331(2), p. 283-295. 2004.

HALKET, J.M.; ZAIKIN, V.G. Derivatization in mass spectrometry -1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9(1), p. 1-21. 2003.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188. 1996.

HÄTTENSCHWILER, S.; VITOUSEK, P.M. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. **Trends in Ecology e Evolution**, v. 15(6), p. 238-243. 2000.

HERRMANN, K.M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, v 107, p. 7-12. 1995.

HOWARD, L.R.; WILDMAN, R.E.C. **Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*)**. In: WILDMAN, R.E.C. Handbook of nutraceuticals and functional foods. Boca Raton: CRC Press, ed. 2. 2007. p. 165-191.

HUANG, X.F.; XUE, J.Y.; JIANG, A.Q.; ZHU, H.L. Capsaicin and its analogues: structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20(21), p. 2661-2672. 2013.

INGKANINAN, K.; HERMANS-LOKKBOL, A.C.J.; VERPOORTE, R. Comparison of some centrifugal partition chromatography systems for a general sepereton of plant extract. **Journal of Liquid Chromatography e Related Tecnologies**, v. 22, p. 885-896. 1999.

ISHIKAWA, K.; JANOS, T.; SAKAMOTO, S.; NUNOMURA, O. The contents of capsaicinoids and their phenolic intermediates in the various tissues of the plants of *Capsicum annuum* L. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 17, p. 22-25. 1998.

JOSSE, A.R.; SHERRIFFS, S.S.; HOLWERDA, A.M.; ANDREWS, R.; STAPLES, A.W.; PHILLIPS S.M. Effects of capsinoid ingestion on energy expenditure and lipid oxidation at rest and during exercise. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 7, p. 65. 2010.

KANG, J.H.; TSUYOSHI, G.; LE NGOC, H.; KIM, H.M.; TU, T.H. ; NOH, H.J.; KIM, C.S.; CHOE, S.Y.; KAWADA, T.; YOO, H.; YU R. Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 310-315. 2011.

KEURENTJES, J.J.B.; FU, J.; DE VOS, C.H.R.; LOMMEN, A.; HALL, R.D.; BINO, R.J.; VAN DER PLAS L.H.; JANSEN, R.C.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. The genetics of plant metabolism. **Nature Genetics**, v. 38(7), p. 842-849. (2006).

KIM, I.K.; EL-ATY, A.M.A.; SHIN, H.C.; LEE, H.B.; KIM, I.S.; SHIM, J.H. Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annuum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas chromatography-flame ionization

detector and confirmation with mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 487-494. 2007.

LANNES, S.D.; FINGER, F.L.; SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v.112, p.266-270, 2007.

LEE, T.A.; LI, Z.; ZERLIN, A.; HEBER, D. Effects of dihydrocapsiate on adaptive and diet-induced thermogenesis with a high protein very low calorie diet: a randomized control trial. **Nutrition and Metabolism**, v. 7, p. 78. 2010.

LEETE, E.; LOUDEN, M.C.L. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum annuum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, p. 6837-6841. 1968.

LEMOINE, R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1465, ed. 1-2, p. 246-262. 2000.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-396. 2006.

LONERAGAN, J.F. Plant nutrition in the 20th and perspectives for the 21st century. **Plant and Soil**, v. 196, p. 163-174. 1997.

LU, H.F.; CHEN, Y.L.; YANG, J.S.; YANG, Y.Y.; LIU, J.Y.; HSU, S.C.; LAI, K.C.; CHUNG, J.G. Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells in vitro and colo 205 tumor xenografts in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12999-13005. 2010.

LUGING, P.A.; VAN DER VURST DE VRIES, R.; YÜKSEL, D.; EBBENHORST-SELLER, T.; WICHERS, H.J.; ROOZEN, J. P. Combined instrumental and sensory evaluation of flavor of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) harvested at three maturation stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2855-2861. 1994.

LUO, X.J.; PENG, J.; LI, Y.J. Recent advances in the study of capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, p. 1-7. 2010.

MA, J.F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 383-90. 2000.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J.I.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M.L.; HASEGAWA, P.M.; JOLY, R.J.; BRESSAN, R.A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal**, v. 31, p. 699-712. 2002.

MAIHOFNER, C.; HESKAMP, M.L. Prospective, non-interventional study on the tolerability and analgesic effectiveness over 12 weeks after a single application of capsaicin 8% cutaneous patch in 1044 patients with peripheral neuropathic pain: first

results of the QUEPP study. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, p. 673-683. 2013.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SONOJA, R.; SANCHEZ, S. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 484-488. 2003.

MANN, J.; DVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBORNE, J.B. **Natural Products: their Chemistry and Biological Significance**. New York: Prentice Hall, ed. 1. 1994.

MAOKA, T.; MOCHIDA, K.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; ENJO, F.; OGATA, M.; NOBUKUNI, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. **Cancer Letters**, v. 172, p. 103-109. 2001.

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

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50(1), p. 5-18. 2000.

MATERSKA, M.; PIACENTE, S.; STOCHMAL, A.; PIZZA, C.; OLESZEK, W.; PERUCKA, I. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. **Phytochemistry**, v. 63, p. 893-898. 2003.

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, F.; MORIMUTA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 17, p. 890-895, 1976.

MAZOUREK, M.; PUJAR, A.; BOROVSKEY, Y.; PARAN, I.; MUELLER, L.; JAHN, M.M. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. **Plant Physiology**, v. 150(4), p. 1806-1821. 2009.

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A., ANGHINONI, I.; BOHNEN, H. Root growth and production of organic acids by soybean cultivars with different tolerance to aluminum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36 (11), p. 1339-1345. 2001.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SCHMITZER, V.; JAKOPIC, J.; CUNJA, V.; VEBERIC, R.; MUNDA, A.; STAMPAR, F. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 138-145. 2013.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. New York: Springer – Verlag, 1995. 629 p.

MOON, D.O.; KANG, C.H.; KANG, S.H.; CHOI, Y.H.; HYUN, J.W.; CHANG, W.Y.; KANG, H.K.; KOH, Y.S.; MAENG, Y.H., KIM, Y.R.; KIM, G.Y. Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 up-regulation: involvement of Ca(2+) influx. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 259, p. 87-95. 2012.

MORI, A.; LEHMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J.C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W.H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H.P. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 3222-3229. 2006.

NAVARRO, J.M.; FLORES, P.; GARRIDO, C.; MARTINEZ, V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. **Food Chemistry**, v. 96, p. 66-73. 2006.

NEITZKE, R.S. **Caracterização morfológica e distância genética entre variedades de pimentas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. 56 p.

NEITZKE, R.S. **Recursos genéticos de pimentas do gênero Capsicum - explorando a multiplicidade de usos**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012. 114 p.

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

NWOKEM, C.O.; AGBAJI, E.B.; KAGBU, J.A.; EKANEM, E.J. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. **New York Science Journal**. v.3(9), p.17-21. 2010.

PADILHA, Henrique Kuhn Massot. **Variabilidade genética em acessos de pimentas (*Capsicum annuum*)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, 2014. 63 p.

PARK, E.S.; KIM, S.R.; JIN, B.K. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress. **Brain Research Bulletin**, v. 89, p. 92-96. 2012.

PLETSCH, M. Aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 12-15. 1998.

PRATELLI, R.; PILOT, G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65 (19), p. 5535-5556. 2014.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. **Química Nova**, v. 32(6), p. 1620-1634. 2009.

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

RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; LÓPEZ-GOMOLLÓN, S.; ABADÍA, J.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A. Development of a new high-performance liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for the determination

of low molecular mass organic acids in plant tissue extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59 (13), p. 6864-6870. 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27 (5), p. 771-780. 2004.

RIBEIRO, C.S.C.; HENZ, G.P.; VILELA, N.J.; AMARO, G.B.; MELO W.F.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Árvore do Conhecimento: Pimenta**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn05zz5y02wx5ok0liq1mqmbc6m9w.html>. Acesso em: 24/01/2016

RIBEIRO, C.S.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Genética e melhoramento: Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 55-69 p.

RICKWOOD, D.; HAMES, B.D. **Gas Chromatography: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, ed. P.J. BAUGH. 1993.

RODONI, L.M.; ZARO, M.J.; HASPERU, J.H.; CONCELL, A.; VICENTE, A.R. UV-C treatments extend the shelf life of fresh-cut peppers by delaying pectin solubilization and inducing local accumulation of phenolics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 408-414. 2015.

RODRIGUES-AMAYA, D. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. OMNI Research, ILSI Human Nutrition Institute: Washington D. C., 2001. 64p.

ROSA, A.; DEIANA, M.; CASU, V.; PACCAGNINI, S.; APPENDINO, G.; BALLERO, M.; DESSÍ, M.A. Antioxidant activity of capsinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7396-7401. 2002.

ROYS, R.L. **The Ethno-Botany of the Maya**. Reprinted 1976, Institute for the Study of Human Issues, Philadelphia. 1931.

SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Z. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v. 61, p. 527-535. 2006.

SANTOS, M.S.; TELES, J.S.; SANTOS, R.M.; GERVASIO, A.P.G. Determination of organic acids in tropical juice fruits by Capillary Zone Electrophoresis. **Scientia Plena**, v. 9 (7), p.1-10. 2013.

SCOVILLE, W. L. Note on *Capsicum*. **Journal of American Pharmaceutical Association**, v. 1, p. 453-454. 1912.

SIVIERO, P. Il peperoncino piccante. **Essenze Derivati Agrumari**, v. 72, p. 53-72. 2002.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, v. 51, p. 49-8. 2000.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p.1057-1060. 1989.

SON, H.S., KIM, K.M., VAN DEN BERG, F., HWANG, G.S., PARK, W.M., LEE, C.H., HONG, Y.S. H-1 nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56(17), p. 8007-8016. 2008.

STEWART, C.; KANG, B.C.; LIU, K.; MAZOUREK, M.; MOORE, S.L.; YOO, E.Y.; KIM, B.D.; PARAN, I.; JAHN, M.M. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. **The Plant Journal**, v. 42, p. 675-688. 2005.

STINE, C.B.; NOCHETTO, C.B.; EVANS, E.R.; GIESEKER, C.M.; MAYER, T.D.; HASBROUCK, N.R.; REIMSCHUESSEL, R. Depletion of melamine and cyanuric acid in serum from catfish *Ictalurus punctatus* and rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3426-3432. 2012.

SUKRASNO, N.; YEOMAN, M.M. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. **Phytochemistry**, v. 32, p. 839-844. 1993.

TIKUNOV, Y., LOMMEN, A., DE VOS, C. H. R., VERHOEVEN, H. A., BINO, R. J., HALL, R. D., BOVY, A.G. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. **Plant Physiology**, v. 139(3), p. 1125-1137. 2005.

UENOJO, M.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Carotenoids: properties, applications and biotransformation in flavor compounds. **Química Nova**, v. 30(3), p. 616-622. 2007.

URBAN, L.; WHITE, J.P.; NAGY, I. Molecular structure of transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1). **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 115-121. 2011.

VARELLA, C.A.A. **Análise Multivariada Aplicada as Ciências Agrárias: Análise de Componentes Principais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, IT-Departamento de Engenharia, Seropédica, RJ. 2008. 12 p.

VASCONCELOS, C.S. **Avaliação agronômica e caracterização da produção de compostos bioativos em variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012. 62p.

VERBRUGGEN N.; HERMANS C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35(4), p. 753-759. 2008.

WAHYUNI, Y.; BALLESTER, A.R.; TIKUNOV, Y.; DE VOS, R.C.; PELGROM, K.T.; MAHARIJAYA, A.; SUDARMONOWATI, E.; BINO, R.J.; BOVY, A.G. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics**, v.9(1), p. 130-144. 2013.

WANG, H.B.; NAIR, R.G.; STRASBURG, G.R.; CHANG, Y.C.; BOOREN, A.R.; GRAY, J.I.; DEWITT, D.L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from Tart Cherries. **Journal of Natural Products**, v. 62(2), p. 294-296. 1999.

WANG, H.M.; CHUANG, S.M.; SU, Y.C.; LI, Y.H.; CHUEH, P.J. Down-regulation of tumor-associated NADH oxidase, tNOX (ENOX2), enhances capsaicin-induced inhibition of gastric cancer cell growth. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, p. 355-366. 2011.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X.Q.; LIN, J.M. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 285-292. 2003.

WU, X.L.; PRIOR, R.L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53(10), p. 4290-4302. 2005.

YALINKILIC, O.; ENGINAR, H. Effect of X-radiation on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats treated with saponin-containing compounds. **Photochemistry Photobiology**, v. 84(1), p. 236-42. 2008.

ZAIKIN, V.G.; HALKET, J.M. Derivatization in mass spectrometry -2. Acylation, **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9(5), p. 421-434. 2003.

ZENI, A.L.; BOSIO, F. Use of medicinal plants in a rural community of the Atlantic Forest – Nova Rússia, SC. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 6(1), p. 55-63, 2011.

ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P.W. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. **Euphytica**, v. 111 (3), p. 185-190. 2000.

ZHANG, J.H.; LAI, F.J.; CHEN, H.; LUO, J.; ZHANG, R.Y.; BU, H.Q.; WANG, Z.H.; LIN, H.H.; LIN, S.Z. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in apoptosis induced by capsaicin in the human pancreatic cancer cell line PANC-1. **Oncology Letters**, v. 5, p. 43-48. 2013.

ZHOU, J.; ZHANG, L.; LI, X.; CHANG, Y.; GU, Q.; LU, X.; ZHU, Z.; XU, G. Metabolic profiling of transgenic rice progeny using gas chromatography–mass spectrometry: the effects of gene insertion, tissue culture and breeding. **Metabolomics**, v. 8(4), p. 529-539. 2011.

ZÖRB, C.; LANGENKÄMPER, G.; BETSCHE, T.; NIEHAUS, K.; BARSCH, A. Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54(21), p. 8301-8306. 2006.