

Detecção de capsaicina em extratos dos frutos verdes e maduros de *Capsicum baccatum* L. pelas metodologias de cromatografia em camada delgada e histoquímica

Detection of capsaicin in extract of green and ripe fruits of Capsicum baccatum L. by methods of thin layer chromatography and histochemistry.

Recebido em: 21/02/2015

Aceito em: 05/06/2015

Juliana Cristina dos Santos ALMEIDA¹, Tamires de Souza RODRIGUES², Katiúscia Freire de SOUZA³, Rosana Gonçalves RODRIGUES-DAS-DORES⁴, Tanus Jorge NAGEM⁴

¹Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. ²Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373, 2º Andar, Bloco A, sala A2-93, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Universidade Federal de Viçosa – UFV, Av. PH Rolfs, s.n. CEP 37500-000, Viçosa, MG, Brasil. ⁴Centro de Saúde, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Bauxita, CEP 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. E-mail: jucris78@gmail.com

ABSTRACT

“Girl’s finger” pepper (*Capsicum baccatum* L.) is a species used worldwide for its spicy flavor and has many medicinal activities. These activities are due to a group of substance in the species from capsaicinoids class, mainly capsaicin. Also, can be found other compounds such as tannins, flavonoids, vitamin C, among others. The aim of this study was to evaluate the presence of capsaicin in extracts of green and ripe fruits of *Capsicum baccatum* L. by thin layer chromatography method. The extracts were prepared with acetone. Chromatography was performed on silica gel G4 plates, eluted with hexane: ethyl acetate (60:40) and revealed with Dragendorff reagent. Capsaicin could detected only in immature stage (green) fruit of *Capsicum baccatum* L.

Keywords: pepper, capsaicin, *Capsicum*, histochemistry

RESUMO

A pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* L.) é uma espécie utilizada no mundo inteiro pelo seu sabor picante e por possuir inúmeras atividades medicinais. Essas atividades farmacológicas são proporcionadas por um grupo de substâncias presentes, os capsaicinoides, além de taninos, flavonoides, vitamina C, entre outros. Dos capsaicinoides presentes, a capsaicina possui especial importância. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença da capsaicina nos extratos dos frutos verdes e maduros de *Capsicum baccatum* L. pelas metodologias de cromatografia em camada delgada e histoquímica. Os extratos foram preparados com acetona. A cromatografia foi realizada com placas de sílica gel G4, eluída com hexano:acetato de etila (60:40) e reveladas com reagente de Dragendorff. A capsaicina pode ser detectada somente no estágio imaturo (verde) dos frutos de *Capsicum baccatum* L. pela metodologia de cromatografia em camada delgada e pelo teste histoquímico.

Palavras chave: pimenta, capsaicina, *Capsicum*, histoquímica

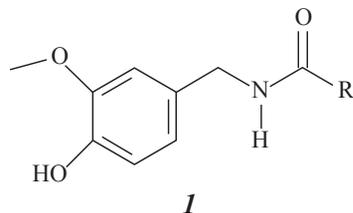
INTRODUÇÃO

As pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae e são consideradas especiarias utilizadas no mundo inteiro por suas propriedades de sabor, cor e pungência. O gênero *Capsicum* compreende cerca de 30 espécies conhecidas ao redor do mundo; entretanto, somente 4 a 5 espécies são cultiváveis (1).

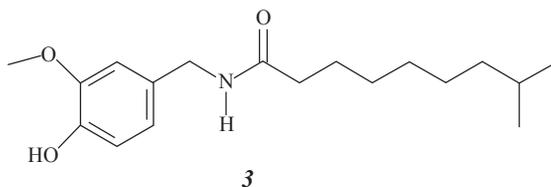
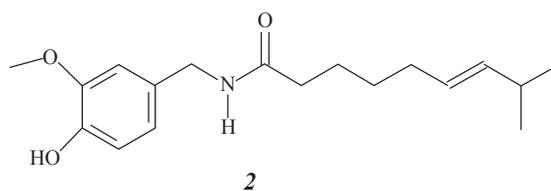
A espécie *Capsicum baccatum* L. é geralmente distinta das outras espécies pelas manchas amarelas ou marrons na corola de suas flores e pelas anteras amarelas. Essa espécie é cultivada na Argentina, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil. Na América do Norte seu crescimento é limitado e na Califórnia é conhecida sob o nome de Mild-Italian e em Nevada como Chileno (2).

As plantas são altas, possuem caules múltiplos, eretos e tendem à expansão. Contudo, quando cultivadas em jardins, tendem a ficar como pequenas árvores. Seu período de crescimento é de 120 dias ou mais, e as plantas podem produzir mais de 40 frutos. As folhas são largas e cor verde-escuras medindo cerca de 17 cm de comprimento por 10 cm de largura. Os frutos são firmes, tipicamente compridos, com sementes cor creme, medindo entre 8 cm a 15 cm de comprimento por 1,8 cm a 2,5 cm de largura. De forma geral iniciam-se eretos e tornam-se pendentes quando maduros, de cor vermelho-alaranjada ou amarela e marrom em algumas variedades (3).

As pimentas do gênero *Capsicum*, dentre elas a espécie *Capsicum baccatum* L. são reconhecidas por um grupo de substâncias químicas, tais como a vitamina C, os flavonoides, taninos, carotenoides, terpenoides e capsaicinoides. O grupo dos capsaicinoides [1] possui substâncias responsáveis por várias atividades medicinais das pimentas vermelhas.



Os capsaicinoides [1] presentes nessas espécies são representados por nornorcapsaicina, norcapsaicina, homocapsaicina, normordiidrocapsaicina, capsaicina [2], hordiidrocapsaicina, diidrocapsaicina [3] e homodiidrocapsaicina (4). O metabólito mais importante desse gênero é a capsaicina [2], sendo conhecida por três propriedades principais, sendo elas anti-inflamatória, antioxidante e potencial liberador de endorfina (5,6).



A síntese da capsaicina ocorre a partir dos aminoácidos fenilalanina ou valina pela rota dos fenilpropanoides, por meio da ação de múltiplas enzimas (7). O acúmulo de capsaicinoides nos frutos da espécie *Capsicum baccatum* L., dentre eles a capsaicina, varia com a idade, tamanho e estágio de desenvolvimento dos frutos e a concentração de carotenoides (8).

A utilização segura de plantas medicinais e o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil dependem do desenvolvimento de metodologias adequadas, que estabeleçam o controle de qualidade destes medicamentos. A segurança dos produtos de origem vegetal está diretamente relacionada à qualidade química dos mesmos (9). Na literatura consultada, são citados métodos de controle da qualidade utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (10, 11), cromatografia gasosa (CG) (12, 13, 14), e cromatografia em camada delgada (CCD) (15, 16) como eficientes para confirmar a presença de princípios ativos ou marcadores químicos e garantir a qualidade química de produtos farmacêuticos acabados (9).

A qualidade do material vegetal a ser utilizado pela população ou em pesquisas precisa ser assegurada para alcançar os efeitos e resultados esperados. E diversas pesquisas utilizando técnicas histoquímicas têm sido utilizadas com o intuito da caracterização química de materiais vegetais. (17).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia analítica qualitativa por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e histoquímica visando confirmar a presença da capsaicina nos extratos acetônicos dos frutos verdes e maduros de *Capsicum baccatum* L.

MÉTODO

Coleta do material vegetal

O material vegetal foi coletado no distrito de Amarantina, município de Ouro Preto, MG, localizado a 23

km da sede do município. A identificação foi realizada pelo botânico Professor Doutor João Renato Stehmann da Universidade Federal de Minas Gerais e o material-testemunha foi depositado no Herbário Professor José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) sob a denominação OUPR23178. A espécie utilizada foi *Capsicum baccatum* L.

Os frutos da pimenta dedo-de-moça foram coletados em dois diferentes estágios de maturação imaturo (verde) e maduro (vermelha).

Caracterização histoquímica dos frutos

A caracterização microscópica de *Capsicum baccatum* L. foi realizada utilizando a região apical de frutos imaturos (verdes) e maduros (vermelhos) (Figura 1).

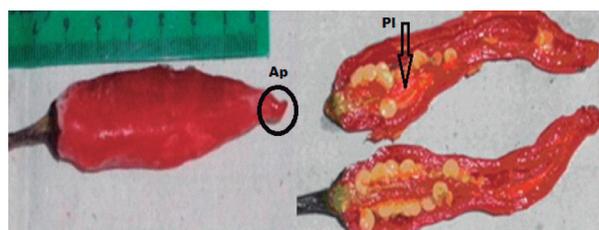


Figura 1: Regiões do fruto de *Capsicum baccatum* L, utilizadas para a análise histoquímica (Ap) e para a obtenção dos extratos (Pl)

A partir dos frutos totalmente expandidos, foram realizados cortes transversais à mão livre com o auxílio de lâmina cortante. Os cortes mais finos foram selecionados com a ajuda de um pincel nº 2 e montados em água glicerina 30% (lâminas semipermanentes). Os exemplares selecionados foram submetidos às reações de coloração com Reagente de Dragendorff (18) para a detecção de alcaloides. As imagens foram analisadas no Microscópio Leica DM5000B e capturadas em programa Leica Application Suite.

Preparo dos extratos

Os extratos orgânicos de *Capsicum baccatum* L. foram obtidos de acordo com a metodologia de Perucka e Oleszek (2000). Os frutos imaturos e maduros foram selecionados, higienizados, partidos, as sementes retiradas e as placentas maceradas em acetona P.A. A metodologia de extração utilizada foi a maceração exaustiva, pelo período de 7 dias (19). Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (BÜCHI R-114) a 40°C até a secura, e dessecados à temperatura ambiente. O rendimento do extrato foi calculado a partir da relação do peso deste com o peso da droga vegetal expresso em porcentagem [(g extrato seco x 100)/g droga vegetal = % rendimento].

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A caracterização da amostra foi realizada utilizando, para fins comparativos, o marcador químico. A amostra e o marcador químico foram aplicados em igual volume (10 µL) em placas cromatográficas de sílica gel G4 (Merck) em aparelho manual com 0,025 mm de espessura e ativadas em estufa a 110 °C por 2 horas, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (60:40). O marcador químico usado para a pesquisa foi a capsaicina (SIGMA ALDRICH) aplicada na concentração de 2 mg/100 µL em tríplice aplicação. Todos os extratos foram eluídos com quatro repetições para cada estágio de maturação e aplicados na mesma concentração que o marcador químico. Após a eluição, os cromatogramas foram expostos à luz ultravioleta, as bandas cromatográficas foram analisadas e, em seguida, reveladas por reagente de Dragendorff. Para todas as bandas foi calculado o Rf e em seguida as imagens foram digitalizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capsaicinoides é a denominação dada ao grupo de compostos presentes em representantes do gênero *Capsicum* responsáveis pela maior parte das atividades biológicas atribuídas a essas espécies (20). Dentre as atividades biológicas da capsaicina podem ser citadas a proteção contra processos carcinogênicos e mutagênicos (21), atividade nematicida (22), tratamento tópico da dor neuropática (23), dentre outros.

O rendimento dos extratos em acetona produzidos a partir dos frutos verdes e vermelhos dos frutos frescos da pimenta *Capsicum baccatum* L. estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento dos extratos em acetona dos frutos imaturos e maduros da espécie *Capsicum baccatum* L.

Estágio de maturação	Rendimento (%)
Imaturo	4,17
Maduro	3,18

Na pesquisa de alcaloides foram realizados cortes transversais dos frutos verdes e vermelhos de *Capsicum baccatum* L., tratados com reagente de Dragendorff. O desenvolvimento de coloração castanho-avermelhada caracterizou reação positiva para essa classe de substância nos frutos verdes e reação negativa nessa classe de substância nos frutos vermelhos (Figura 2).

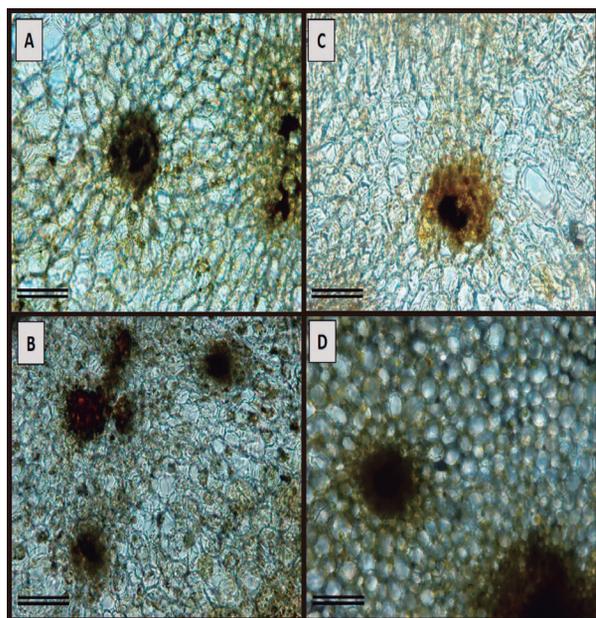


Figura 2: Análise histoquímica de frutos de *Capsicum baccatum* L. (A) Fruto maduro (controle); (B) fruto maduro após reação de Dragendorff; (C) Fruto verde (controle); (D) fruto maduro após reação de Dragendorff;

As pimentas, em sua maioria, possuem sabor pungente característico, devido à presença do alcaloide capsaicina [2] na placenta e nas sementes. Essa substância pode ser encontrada, em menor grau, no pericarpo do fruto maduro (24).

A análise histoquímica dos frutos imaturos de *Capsicum baccatum* L. revelou a presença de alcaloides na placenta dos frutos. Essa classe de substâncias é comumente relatada como fazendo parte do metabolismo das espécies do gênero *Capsicum* em diferentes graus de concentração, sendo produzidos em glândulas localizadas na placenta dos frutos (25, 26).

Segundo Stark (2008) quanto maior o grau de maturação da pimenta, maior será o conteúdo de capsaicina nos frutos. Entretanto, os resultados encontrados para a pesquisa histoquímica mostraram que a capsaicina pode ser detectada nos frutos imaturos e não nos frutos maduros (24).

O padrão escolhido no desenvolvimento da cromatografia em camada delgada foi a capsaicina (Sigma Aldrich), por ser uma das moléculas responsáveis pela ação biológica e por ser encontrada em maior concentração nas espécies do gênero *Capsicum* (24).

Os cromatogramas produzidos a partir do extrato acetônico dos frutos verdes da espécie *Capsicum baccatum* L. mostraram o mesmo perfil químico do marcador capsaicina, sendo suficiente para estabelecer o controle de qualidade qualitativo desse extrato. Os valores dos

fatores de retenção (Rf) para a capsaicina e os extratos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores do fator de retenção (Rf) de capsaicina em extratos acetônicos de *Capsicum baccatum* L. em dois diferentes estágios de maturação

Estágios de maturação	Rf capsaicina	Rf extrato
Imaturo	0,328	0,325
Maduro	0,318	-

Nos cromatogramas do extrato acetônico do fruto maduro não foram observadas bandas que correspondessem à capsaicina. Esse fato pode ter ocorrido pela inexistência ou menor concentração dessa substância no estágio de maturação especificado.

No extrato acetônico dos frutos imaturos, foram detectadas bandas cromatográficas com valores de Rf semelhantes ao padrão aplicado (diferença menor que 0,05) em três das quatro repetições realizadas, caracterizando a presença desse capsaicinoide.

Os resultados confirmaram os dados observados na análise histoquímica, demonstrando a presença de capsaicina no extrato dos frutos imaturos e ausência dessa substância no extrato dos frutos maduros.

Segundo Topuz & Ozdemir (2007) a concentração de metabólitos secundários encontrados em espécies de *Capsicum* sofre influência do genótipo e do grau de maturação dos frutos (23).

Os componentes responsáveis pelo sabor e pela pungência das pimentas do gênero *Capsicum* são sintetizados pela via do ácido cinâmico e eles são degradados, conforme a maturação, por ação das enzimas peroxidases. A concentração de capsaicina nos frutos das espécies do gênero *Capsicum*, dentre elas a espécie *Capsicum baccatum* L. aumenta durante a maturação dos frutos, sofrendo um rápido decréscimo no estágio maduro. Isso ocorre devido à presença da enzima peroxidase na placenta dos frutos (26,27). Esse fato pode justificar a observação da capsaicina no extrato dos frutos verdes da pimenta *Capsicum baccatum* L. pelas metodologias de cromatografia em camada delgada e histoquímica.

CONCLUSÃO

A metodologia por cromatografia em camada delgada permitiu visualizar a presença do alcaloide capsaicina no extrato acetônico de frutos verdes de *Capsicum baccatum* L., também caracterizados na histoquímica

vegetal dos frutos. Estas análises de fácil execução podem ser utilizadas como técnicas rápidas a serem utilizadas no controle da qualidade de extratos e/ou da matéria-prima vegetal, validando, nestas condi-

ções experimentais, metodologia analítica para identificação vegetal (anatômica e química) da espécie para a fabricação de fitoterápicos ou padronização de extratos.

REFERÊNCIAS

- López P, Gorzalczy S, Acevedo C, Alonso R, Ferraro G. Chemical study and anti-inflammatory activity of *Capsicum chacoense* and *C. baccatum*. *Rev Bras Farmacogn* 2012; 22(2): 455-458. DOI 10.1590/S0102-695X2011005000187.
- Ferraz RM. Caracterização preliminar morfológica e agrônômica de pimentas cumari (*Capsicum baccatum* L. var. *praetermissum* e *Capsicum baccatum* L. var. *baccatum*). [Monografia]. Brasília – Distrito Federal: Universidade de Brasília; 2012.
- Rêgo, ER, Rêgo, MM., Cruz, CD, Finger, FL, Casali, VWD. Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genet Resour Crop Evol.* 2011; 58: 909-918. DOI 10.1590/S0034-737X2014000100011.
- Morán-Bañuelos, SH, Aguilar-Rincón, VH, Corona-Torres, T, Castillo-Gongález, F, Soto-Hernández, RM, Miguel-Chávez, R. Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociência.* 2008; 42: 807-816.
- Carvalho HH, Wiest JM, Cruz FT. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum sp.*) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. *Rev Bras Plantas Med.* 2010; 12(1): 8-12.
- Islam MS, Matsui, T, Yoshida, Y. Effects carbon enrichment on physico-chemical and enzymatic changes in tomatoes fruits at various stages of maturity. *Scientia Horticulturae.* 1996; 65(2): 137-149. DOI 10.1016/0304-4238(95)00867-5.
- Thiele R, Mueller-Seitz, Petz M. Chili pepper fruits: Presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. *J.Agric.Food Chem.* 2008; 56: 4219-4224. DOI: 10.1021.
- Paula FLM. Aplicação de CO₂ via irrigação na pimenta Tabasco cultivada em ambiente protegido [Tese]. Piracicaba – São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
- Alves, MM, Pereira, MAS, Pereira, OS, França, SC, Bertoni, BW. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. *Scientia Plena.* 2011; 7: 1-8.
- Marques, THC, Santos, OS, Freitas, RM, Carvalho, RBF, Melo, CHS, David, JP, David, JM, Lima, LS. Atividade anticolinesterásica e perfil químico de uma fração cromatográfica ativa do extrato etanólico das flores *Bellis perennis* L. (Asteraceae). *Quim. Nova.* 2013; 36(4): 549-553.
- Santi, MM, Sanches, FS, Silva, JFM, Santos, PML. Determinação do perfil fioquímico do extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenaceae* DC. por HPLC-DAD. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2014; 16(2): 256-261.
- Romero, AL, Romero, RB, Silva, EL, Diniz, SPSS, Oliveira, RR, Vida, JB. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. *Cient Ciênc Biol Saúde.* 2012; 14(4): 231-235.
- Amaral, W, Deschamps, C, Machado, MP, Koeler, HS, Scheer, AP, Côcco, LC. Desenvolvimento da camomila, rendimento e qualidade do óleo essencial em diferentes idades de colheita. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2014; 16(2): 237-242.
- Pinto, DA, Mantovani, EC, Melo, EC, Sediya, GC, Vieira, GHS. Produtividade de qualidade do óleo de capim-limão, *Cymbopogon citratus* D.C., submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2014; 16(1): 54-61.
- Santos, GA, Brenzan, MA, Serra, LZ. Influência do cultivo na produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial de *Mentha spicata*. *Rev. Saúde e Biol.* 2013; 8(3): 19-25.
- Borges, EC, Silva, LC, Alencar, SM, Aguiar, CL. Caracterização química de extratos etanólicos de própolis com atividade inibitória do crescimento de estafilococos isolados de mastite bovina. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.* 2014; 8(1): 1040-1153.
- Abud, HF. Caracterização de frutos, histoquímica e qualidade fisiológica de sementes de pimenta durante a maturação. (Tese) Viçosa: Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. 2013.
- Svenden AB, Verpoorte R. *Chromatography of alkaloids.* Elsevier Scientific: Publishing Company; 1983.
- Perucka, I, Oleszek, W. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2000; 71: 287-291. DOI 10.1016/S0308-8146(00)00153-9.
- Surh, Y. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in the red pepper and ginger. *Mutation Research.* 1998; 402: 259-267.
- Neves, WS. Ação nematocida de óleo, extratos vegetais e de dois produtos à base de capsaicina, capsaicinoides e alil isotiocianato sobre Juvenis de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Nematol Bras.* 2008; 32(2): 93-100.

22. Dog, T.L. A reason to season: The therapeutic benefits of spices and culinary herbs. *Explore*. 2006; 2: 446-449. DOI 10.1016/J.EXPLORE.2006.06.010.
23. Topuz, A, Ozdemir, F. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annum* L.) grown in Turkey. *J Food Comp Anal*. 2007; 20: 596-602. DOI 10.1016/j.jfca.2007.03.007.
24. Stark, CB. Características e benefícios da capsaicina. (Monografia) Pelotas: Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2008.
25. Pinto, CMF, Pinto, CLO, Donzeles, SML. Pimenta Capsicum: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. *Rev Bras Agropec Sustentável*. 2013; 3(2): 108-120.
26. Souza, PTS, Rossi, AV. Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinoides em pimentas *Capsicum* a partir da reação com o complexo de Co(III) com 4-(2-piridilazo) resorcinol. *Química Nova*. 2014; 37(4): 631-637. DOI 10.5935/0100-4042.20140100.
27. Contreras-Padilla, M, Yahia, EM. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity. *J.Agric.Food Chem*. 1998; 46: 2075-2079. DOI 10.1021/jf970972z.
28. Purvis, MJ, Collier, DC, Walls, D. *Laboratory techniques in botany*. London: Butterwoths; 1964.