

Foto: Leonora Mattos



Protocolos de avaliação da qualidade química e física de pimentas (*Capsicum spp.*)

Leonora Mansur Mattos¹
Celso Luiz Moretti²
Gilmar Paulo Henz³

O conhecimento do comportamento fisiológico de frutas e hortaliças no período pós-colheita permite a adoção de uma série de estratégias visando à maior conservação e comercialização desses produtos. A avaliação da qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças é uma prática rotineira em diversos laboratórios no Brasil e no mundo.

As pimentas possuem grande importância sócio-econômica, sendo exploradas tanto pela agricultura familiar como em cultivos agroindustriais. O mercado é bastante diversificado, indo desde o consumo *in natura* e conserva caseiras até a exportação do produto industrializado.

Entretanto, pouco se sabe sobre as características de qualidade desta hortaliça, principalmente por haver uma grande diversidade e pouca literatura sobre as análises para acompanhar sua vida de prateleira.

Comercialmente, os frutos de *Capsicum* são avaliados pela cor, que depende basicamente do teor de carotenóides do fruto, e pela pungência, que está ligada à concentração de compostos denominados *capsaicinóides*, embora todas as características de qualidade devam ser levadas em consideração para sua comercialização. Apresentando diferentes

¹ Pesquisadora, DSc., Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. E-mail: leonora@cnph.embrapa.br

² Pesquisador, DSc., Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. E-mail: moretti@cnph.embrapa.br

³ Pesquisador, DSc., Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. E-mail: gilmar@cnph.embrapa.br

variedades, formas e usos, os frutos de *Capsicum* contribuem para uma vasta gama de experiências sensoriais, como aparência, cor, aroma, pungência, textura.

A caracterização química e física de frutas e hortaliças no período pós-colheita tem vários objetivos, tais como suporte a programas de melhoramento, avaliação do efeito de diferentes fatores ou tratamentos pré-colheita na qualidade pós-colheita ou ainda, o que é mais comum, avaliação da qualidade do produto colhido após o mesmo ter sido submetido a diversos tratamentos pós-colheita visando a extensão da vida de prateleira (MORETTI, 2006).

Apesar de rotineiro, não é incomum observar-se que, muitas vezes, os protocolos para avaliação da qualidade pós-colheita de uma determinada fruta ou hortaliça não estão sistematizados e prontamente disponíveis, requerendo trabalho extra dos técnicos envolvidos no processo para o levantamento bibliográfico das diferentes metodologias disponíveis. Dentre as hortaliças que apresentam elevada demanda para avaliação da qualidade pós-colheita estão as pimentas do gênero *Capsicum*, tendo em vista a importância econômica e social no agronegócio brasileiro (MORETTI, 2006). O presente documento tem o objetivo de apresentar metodologias testadas no laboratório de pós-colheita da Embrapa Hortaliças empregadas para avaliação da qualidade pós-colheita de *Capsicum*.

Preparo da amostra – recomendações de caráter geral

A fim de obter-se uma amostra que represente da melhor forma possível

o material que se pretende avaliar, recomenda-se a utilização de amostras compostas nas análises onde o tecido necessitará ser homogeneizado.

A amostra composta é preparada por meio da combinação de diversas amostras simples. Assim, em parcelas representadas por 20 frutos (cada fruto representaria uma amostra simples), por exemplo, sugere-se que estes frutos sejam homogeneizados por processamento, tornando-se assim uma amostra composta, de onde será retirada a amostra que será avaliada para a variável desejada.

Sólidos solúveis totais

A determinação dos sólidos solúveis totais baseia-se na metodologia descrita por Moretti (2006).

Preparo da amostra

No preparo da amostra para análise, fatiar os frutos em tiras de aproximadamente 0,5 cm e congelar por no mínimo 24 horas. Descongelar e apertar as tiras em uma gaze para se obter o líquido a ser medido no refratômetro .

Leitura em refratômetro

O conteúdo de sólidos solúveis é medido num refratômetro de mesa ou de campo e expresso em graus brix. Antes de se fazer a leitura da amostra propriamente dita, o refratômetro deve ser calibrado (“zerado”) com água destilada.

A medição é feita colocando-se uma pequena quantidade do material homogeneizado sobre a superfície do prisma (Figura 1), procedendo-se à leitura de forma direta. O valor encontrado deve ser corrigido de acordo com a temperatura

no momento da leitura, baseando-se em tabelas fornecidas pelo fabricante do equipamento.

Acidez total titulável

A determinação da acidez total titulável baseia-se na metodologia descrita por Moretti (2006).

Preparo da amostra

No preparo da amostra para análise, pesar 10 g do tecido fresco e adicionar 100 mL de água destilada. Homogeneizar os frutos num liqüidificador por 3 minutos. A solução deve ser armazenada em frasco plástico.

Preparo da solução de NaOH a 0,1 mol/L

Pesar 4 g de NaOH em um béquer e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1 L. Completar o volume com água destilada.

Titulação

Proceder à titulação com NaOH (0,1 mol/L) até o pH 8,2, onde se considera que todo ácido cítrico, ácido orgânico predominante em pimentas, foi titulado. A acidez da solução pode ser expressa em percentagem ou em miliequivalentes de

ácido cítrico por kg de tecido fresco (Figura 2).

As seguintes equações são utilizadas para os cálculos:

$$\% \text{ ácido cítrico} = [\text{mL (NaOH)} * \text{C (NaOH)} * 0,064 / 6] * 100$$

$$\text{meq ac. cítrico} = \% \text{ác. cítrico} * 10 / 0,064$$

Capsaicinóides

A determinação dos capsaicinóides nordihidrocapsaicina (N), capsaicina (C), diidrocapsaicina (D) e totais (T) é realizada de acordo com os procedimentos descritos em ASTA – American Society Trade Association (1997).

Preparo do padrão

Solução estoque

Pesar exatamente cerca de 150 mg de N-vanilila-n-nonamida e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolver em álcool etílico grau cromatográfico e completar o volume do balão.

Solução de trabalho

Transferir 2 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100 mL e

Foto: Leonora Mattos



Fig. 1. Colocação da amostra no prisma do refratômetro para leitura do teor de sólidos solúveis totais. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 2. Análise de acidez titulável realizada com titulador automático. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

completar o volume com álcool etílico grau cromatográfico.

Preparo da amostra

Pesar 2 g de amostra moída de *Capsicum* e transferir para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar 80 mL de álcool etílico. Agitar vigorosamente e colocar o balão em um banho a 70 °C, com agitação, por 5 horas. Retirar do banho, resfriar até temperatura ambiente e completar o volume para 100 mL (Figura 3).

Injeção da amostra

Conectar uma seringa de plástico de 5 mL a um filtro milipore 0,45 µm, inserir o filtro diretamente no balão e retirar a amostra. Transferir da seringa para o frasco de vidro, descartando previamente o filtro.

O frasco de vidro deve ser colocado no compartimento de bandeja do cromatógrafo a líquido de alta eficiência e a separação dos capsaicinóides será feita pela injeção de 10 µL de extrato, em uma coluna Luna C18(2), 150 x 4,6 mm, 5 µL (marca Phenomenex), em fase móvel constituída de acetonitrila e água, na proporção de 53:47, sob um fluxo de 2,0 mL/ min.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 3. Extração de capsaicinóides. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

Injeção do padrão

Transferir a solução de trabalho, previamente preparada e filtrada através de um filtro milipore 0,45 µm, para um frasco de vidro. Injetar 10 µL da solução a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência. A separação dos capsaicinóides será feita pela injeção de 10 µL de extrato, em uma coluna Luna C18(2), 150 x 4,6 mm, 5 µL (marca Phenomenex), em fase móvel constituída de acetonitrila e água, na proporção de 53:47, sob um fluxo de 2,0 mL/ min.

Os resultados serão expressos em SHU ('Scoville Heat Units') de nordiidrocapsaicina, capsaicina e diidrocapsaicina e capsaicinóides totais. As seguintes equações serão utilizadas para o cálculo:

$$SHU_N = (M_N/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,98) * (9300)$$

$$SHU_C = (M_C/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,89) * (16100)$$

$$SHU_D = (M_D/M_S)(C_S \times P_S/W_T) * (100/0,93) * (16100)$$

$$SHU_T = SHU_N + SHU_C + SHU_D$$

em que,

SHU_N , SHU_C , SHU_D , SHU_T = SHU dos capsaicinóides nordiidrocapsaicina, capsaicina, diidrocapsaicina e totais, respectivamente.

M_N , M_C , M_D , M_S = média das áreas dos picos de nordiidrocapsaicina, capsaicina, diidrocapsaicina e do padrão, respectivamente.

C_S = concentração do padrão em mg/mL.

Carotenóides totais

A determinação do conteúdo de carotenóides totais baseia-se nas

metodologias descritas por LIME et al. (1957) e UMIEL e GABELMAN (1971), com modificações propostas por MORETTI et al. (1998).

Preparo da amostra e extração dos pigmentos

No preparo da amostra para análise, homogeneizar os frutos num mixer ou liquidificador por 3 minutos. Tomar oito gramas de tecido homogeneizado e adicionar 40 mL de acetona num mixer ou liquidificador e homogeneizar o material por um minuto.

Nota: a tampa do liquidificador não deve estar totalmente fechada, pois tendo em vista a acetona ser extremamente volátil, o fechamento total da tampa pode ocasionar acidentes.

Proceder à filtração a vácuo, em filtro de papel Whatmann nº4, com o auxílio de um kitazato protegido com papel alumínio, para se evitar a foto-oxidação dos pigmentos. Após a filtração, lavar por duas vezes, com 25 mL de acetona, o frasco em que o tecido foi homogeneizado. Adicionar ao filtrado 45 mL de hexano.

Partição das fases

Transferir a solução resultante para um funil de separação, aguardando-se tempo suficiente para que haja uma nítida separação de fases. Tal separação ocorre, em geral, em torno de 20 minutos. Proceder à lavagem do hexano com 100 mL de água destilada que deve ser vagarosamente adicionada pelas paredes do funil de separação. Agitar o funil lentamente, em movimentos circulares alternados, de tal forma a promover-se um contato satisfatório entre as fases e, simultaneamente, evitar-se a formação de uma emulsão entre elas. Após a separação

nítida de fases, descartar a fase inferior e proceder à lavagem com água destilada por mais duas vezes. Após a última lavagem, transferir o extrato hexano-pigmentos para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com hexano.

Leitura em espectrofotômetro

Proceder à leitura do extrato num espectrofotômetro no comprimento de onda de 460 nm. A concentração de carotenóides totais (mg.kg^{-1}) é calculada pela seguinte equação:

$$Ct = (A_{460} \cdot 10^6) / 2200 \cdot m$$

em que

Ct = concentração de carotenóides totais (mg.g^{-1});

A_{460} = absorvância dos pigmentos a 460 nm;

V = volume final da amostra (mL) = 100 mL;

m = massa do tecido fresco (g)

Capsanteno

Extração da cor

Amostras de 0,500 g de *Capsicum* após secagem e moagem são pesadas para determinação do teor de capsanteno de acordo com procedimentos descritos em ASTA (1985). Após pesagem, são transferidas para um balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de 30 mL de acetona p.a. Para a extração de todo o capsanteno, o balão com a amostra e acetona deve ser deixado em repouso por 16 horas ao abrigo da luz.

Procedimento de análise

Após as 16 horas de repouso, completar o volume do balão volumétrico com acetona p.a. e filtrar utilizando-se papel de filtro Whatmann nº4. Transferir o filtrado para uma cubeta e fazer a leitura a 460 nm. Os

resultados obtidos serão expressos em mg de capsanteno/ kg do produto.

Coloração pelo sistema $L^*a^*b^*$

A medida objetiva da coloração de pimentas é realizada por meio de um sistema tri-axial ("tristimulus") de cores fornece três coordenadas ($L^* a^* b^*$) que permitem ao observador determinar com exatidão a coloração do objeto em estudo. Neste sistema, o eixo x corresponde às cores que variam do verde (- a) ao vermelho (+ a); o eixo y corresponde às cores que variam do azul (- b) ao amarelo (+ b) e o eixo z corresponde às cores que vão do branco (+ L) ao preto (- L).

Procedimento de análise

A avaliação da coloração utilizando colorímetro deve ser feita em pelo menos em dois pontos da superfície do fruto, de preferência na região equatorial. O colorímetro deve ser encostado na superfície do fruto e, mantendo-o firmemente em contato, proceder a leitura (Figura 4). Os valores de $L^*a^*b^*$ devem ser anotados para posterior interpretação. As fórmulas mais utilizadas para a interpretação os resultados são ângulo

Hue e Croma, de acordo com as seguintes equações:

$$\text{ângulo Hue} = \arctang(a,b) * 180/\pi$$

$$\text{Croma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

Clorofila

A determinação da clorofila total, a e b é baseada na metodologia descrita por INSKEEP & BLOOM (1985), com modificações realizadas no preparo da amostra, que são descritas abaixo.

Preparo da amostra

Pesar 5 g de discos de 1,0 cm de diâmetro da região equatorial do pericarpo dos frutos. Colocar os discos num almofariz, adicionar 10 mL do solvente N,N-dimetilformamida (DMF) e com o auxílio de um pistilo promover a maceração do material até obter-se um macerado uniforme (Figura 5). Transferir o material para frascos protegidos com papel alumínio, para se evitar a fotodegradação dos pigmentos clorofílicos e adicionar 10 mL de DMF. Armazenar os frascos a 4°C por 7 dias. Retirar os frascos da câmara fria e promover a agitação dos mesmos por 24 h.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 4. Medição da cor (sistema $L^*a^*b^*$) de pimentas com um colorímetro portátil. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 5. Maceração dos discos de pimenta com o auxílio de um pistilo em N,N-dimetilformamida (DMF). Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

Procedimento de análise

Após a agitação, filtrar o solvente em papel-filtro "Miracloth" ou Whatmann n°. 4 e ler a absorvância a 647 nm e 664,5 nm. A concentração de pigmentos (mg.Kg⁻¹) é calculada de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Clorofila total} = 17,95 * A_{647} + 7,90 * A_{664,5}$$

$$\text{Clorofila b} = 20,47 * A_{647} - 4,73 * A_{664,5}$$

$$\text{Clorofila a} = 12,70 * A_{664,5} - 2,79 * A_{647}$$

Evolução de gás carbônico e etileno

A determinação da evolução de gás carbônico e etileno é baseada na metodologia descrita por MORETTI et al. (2007).

Colocação dos frutos em frascos herméticos

Os frutos colhidos devem ser colocados em frascos herméticos providos com tampa e de volume conhecido (Figura 6). Deve ser registrada a massa dos frutos colocados em cada frasco. As tampas devem possuir septos de borracha que permitam que sejam retiradas amostras da atmosfera interna dos frascos, com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 6. Frutos colocados em frascos herméticos para avaliação da evolução de gás carbônico e etileno em sistema fechado. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2008.

Fechamento dos frascos e amostragem

Após a colocação dos frutos, todos os frascos devem ser fechados rapidamente e registrado o momento do fechamento. Após uma hora do fechamento dos frascos, devem ser retiradas amostras da atmosfera interna com o auxílio de uma seringa hipodérmica com capacidade de 1 mL (Figura 7). A agulha deve ser inserida no septo de borracha. Antes de se retirar a amostra é recomendável que a atmosfera interna seja homogeneizada puxando e empurrando o êmbolo da seringa por duas ou três vezes. A amostra de 1 mL deve ser injetada no cromatógrafo à gás para a determinação das concentrações dos gases em estudo.

Caso seja necessário a realização de outras leituras, os frascos devem ser abertos, a atmosfera interna deve ser renovada com o auxílio de um ventilador ou outro aparato semelhante, e somente então deve se proceder novamente o fechamento dos frascos.

Cromatografia gasosa

Antes da injeção das amostras, deve ser injetado o padrão para gás carbônico e etileno nas respectivas colunas.

Foto: Leonora Mattos



Fig. 7. Retirada de amostra da atmosfera interna do jarro com o emprego de seringa hipodérmica de 1 mL. Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, 2007.

Injetar a amostra para gás carbônico na coluna equipada com detector de condutividade térmica (Figura 8). A área e a altura do pico gerado será proporcional à concentração de gás carbônico na amostra. A coluna normalmente usada para gás carbônico é a de Porapak Q (60 a 100 mesh).

Injetar a amostra para etileno na coluna equipada com detector de ionização de chama. A área e a altura do pico gerado será proporcional à concentração de etileno na amostra. A coluna normalmente usada para etileno é a de alumina. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector devem ser de 60°C, 100°C e 140 °C para a análise de CO₂ e de 60°C, 100°C e 150 °C para avaliação de etileno.

Referências Bibliográficas

ASKAR, A.; TREPTOW, H. **Quality assurance in tropical fruit processing**. New York: Springer-Verlag, 1993. 231p.

ASTA. **Official analytical method of the American Spice Trade Association**. 1st ed. New Jersey: Englewood Cliffs, 1985. p.41-42,

ASTA. **Official analytical methods of the American Spice Trade Association** 4th ed. New Jersey: ASTA, 1997. p.165,

BERNSTEIN, Z.; LUSTIG, I. A new method of firmness measurement on grape berries and other juicy fruits. *Vitis*, Geneva, v.20, p.15-21, 1981.

BERNSTEIN, Z.; LUSTIG, I. Hydrostatic methods of measurement of firmness and turgor pressure of grape berries (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.25, p. 129-136, 1985.

CALBO, A. G. Physiology of vacuum induced tomato fruit cracking. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 2, n. 1, p. 55-61, 1990.

CALBO, A. G.; CALBO, M. E. Medição e importância do potencial de parede. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 1, n. 1, p. 41-45, 1989.

CALBO, A. G.; NERY, A. A. Medida de firmeza de hortaliças pela técnica de aplanção. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 13, n.1, n. 1, p. 14-18, 1995.

CALBO, A. G.; NERY, A. A.; HERRMANN, P. S. P. Intercellular deformation in compressed organs. *Annals of Botany*, v. 76, p. 365-370, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

INSKEEP, W. P.; BLOOM, P. R. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology*, v. 77, p. 483-485, 1985.

LIME, B. J.; GRIFFITHS, F. P.; O'CONNOR, R. T.; HEINZELMANN, D. C.; McCALL, E. R. Spectrophotometric methods for determining pigmentation – beta-carotene and lycopene – in ruby red grapefruit. *Agricultural and Food Chemistry*, v. 5, n. 12, p. 941-944, 1957.

MORETTI, C. L.; SARGENT, S. A.; HUBER, D. J.; CALBO, A. G.; PUSCHMANN, R. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, v. 123, n. 4, p. 656-660, 1998.

MORETTI, C. L. Protocolos de avaliação da qualidade química e física de tomate. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2006. 12 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 32).

MORETTI, C. L.; MATTOS, L. M.; MACHADO, C. M. M.; KLUGE, R. A. Physiological and quality attributes associates with different centrifugation times of baby carrots.

Horticultura Brasileira, v.25, n.4, p.543-547, 2007.

NUNES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS A. M. M. B.; SARGENT, S. A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 17-28, 1995.

TERADA, M.; WATANABE, Y.; KUNITOMA, M.; HAYASHI, E. Differential rapid analysis

of ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. **Annals of Biochemistry**. v. 4, p. 604-608, 1979.

UMIEL, N.; GABELMAN, W. H. Analytical procedures for detecting carotenoids of carrot (*Daucus carota* L.) roots and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 96, n. 6, p. 702-704, 1971.

WHITLOW, T. H.; BASSUK, N. L.; RANNEY, T. G.; REICHERT, D. L. An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. **Plant Physiology**, v. 98, p. 198-205, 1992.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



**Comunicado
Técnico, 50**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Hortaliças
BR 060 km 9 Rod. Brasília-Anápolis
C. Postal 218, 70351-970 - Brasília-DF

www.cnph.embrapa.br
Telefone: (61) 3385-9115
Fax: (61) 3385-9042
E-mail: sac@cnph.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): 500 exemplares

Comitê de Publicações: Presidente: Gilmar P. Henz
Secretária-Executiva: Fabiana S. Spada
Editor Técnico: Flávia A. de Alcântara
Supervisor Editorial: Sieglinde Brune
Membros: Alice Maria Quezado Duval
Edson Guiducci Filho
Milza M. Lana

Expediente Normalização Bibliográfica: Rosane M. Parmagnani

Editoração eletrônica: José Miguel dos Santos