

Avaliação via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do perfil de carotenóides em acessos de quatro espécies de *Capsicum*.

José Getúlio da Silva Filho^{1,2}; Maria Esther de Noronha Fonseca^{1,3}; Sabrina Isabel Costa Carvalho^{1,2}, Francisco José Becker Reifschneider¹ & Leonardo Silva Boiteux^{1,3}

¹Embrapa Hortaliças / Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças (CNPq). BR-060, Km 09, 70359-970, Brasília-DF; ²Departamento de Botânica, Universidade de Brasília (UnB), ³CNPq, bolsista de produtividade, jgetulio@cnph.embrapa.br; mesther@cnph.embrapa.br; sabrina@cnph.embrapa.br; fjbr@cnph.embrapa.br; boiteux@cnph.embrapa.br

RESUMO

Os carotenóides são compostos de 40 carbonos que apresentam importantes funções biológicas tanto para a planta quanto para os seres humanos e animais. Os frutos maduros do gênero *Capsicum* apresentam uma grande diversidade de cores que são definidas, em grande parte, por pigmentos do grupo dos carotenóides. A Embrapa Hortaliças possui uma coleção de germoplasma contendo acessos com frutos vermelhos, amarelos, laranjas e marrons. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade de compostos carotenóides em frutos maduros de 15 acessos (de quatro espécies) do gênero *Capsicum* via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os acessos de frutos amarelos apresentaram maior quantidade dos pigmentos luteína e violaxantina. Os acessos de coloração alaranjada apresentaram como principal pigmento o α -caroteno. Os frutos vermelhos apresentaram capsantina/capsorubina como os principais pigmentos. Uma exceção foi o acesso 'Majjorca' que apresentou maior quantidade de β -caroteno em relação à capsantina/capsorubina. Um acesso de *C. chinense* com coloração marrom (chocolate) foi o único que acumulou clorofila no fruto maduro. A diversidade de pigmentos encontrada indica que é possível melhorar a qualidade dos frutos de *Capsicum* combinando carotenóides com diferentes

funções nutracêuticas.

Palavras-chave: *Capsicum annum* L., pigmentos, melhoramento.

ABSTRACT

High performance liquid chromatography analysis of the carotenoid profile in accessions of four *Capsicum* species.

Carotenoids are 40C compounds that play important biological functions in plants and animals. The mature fruits of *Capsicum* display an array of colors, which are mainly characterized by the presence of distinct carotenoid pigments. The Embrapa Vegetable Crops has one large germplasm collection of *Capsicum* accession with different colors ranging from deep red, orange, yellow and brownish. The main objective of the present work was to characterize carotenoid profile of mature fruits of 15 accessions (from four *Capsicum* species) via high performance liquid chromatography (HPLC). The lutein and violaxanthin pigments were predominant in yellow-fruit accessions. The pigment α -carotene was predominant in accessions with orange color. The red-fruit accessions were rich sources of capsorubin and capsanthin. The only exception was the cultivar 'Majjorca', which displayed a large amount of β -carotene when compared with capsorubin and

capsanthin. One *C. chinense* accession with fruits with brown (chocolate) color was the only one with chlorophyll accumulation. The diversity of carotenoid pigments observed here indicated that is feasible to improve (via classical breeding strategies) the nutritional/

nutraceutical quality of *Capsicum* fruits by combining distinct carotenoid in the same genetic background.

Keywords: *Capsicum annum* L., pigments, breeding.

O gênero *Capsicum* L. apresenta enorme importância econômica, englobando diferentes tipos varietais de pimentas e pimentões. Este gênero é formado por aproximadamente 25 espécies selvagens e cinco domesticadas [*Capsicum annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. e *C. pubescens* R e P. (Reifschneider, 2000)]. O cultivo de pimenta e pimentões tem se destacado pela amplitude de utilizações na alimentação humana, sendo empregada como hortaliça de acompanhamento e na forma de molhos. A forma de pó é empregada como flavorizante ou corante devido à diversidade de colorações que podem ser obtidas, variando do amarelo pálido ao vermelho intenso. A coloração do fruto é condicionada, na maioria das vezes, pela presença de compostos carotenóides. Estes compostos apresentam importantes funções fisiológicas atuando na chamada “função de antena”, absorvendo energia solar na região azul-verde do espectro e transferindo esta energia para as clorofilas (Giuliano *et. al.*, 2003). O efeito nutracêutico dos carotenóides em animais e seres humanos se deve ao elevado poder antioxidante destes compostos, o que permite a proteção da função celular pela eliminação de radicais livres. Os carotenóides são também fontes de pró-vitamina A, que é convertida, durante a digestão, para a o retinol, que é a forma ativa da vitamina (Smidt & Burke, 2004). O objetivo do trabalho foi caracterizar via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a diversidade de compostos carotenóides em frutos maduros de acessos de quatro espécies de *Capsicum*. A Embrapa Hortaliças possui uma coleção de germoplasma com cerca de 2000 acessos de *Capsicum*, entre cultivares de polinização aberta, híbridos, populações de materiais cultivados, linhagens e materiais silvestres. Este estudo disponibiliza informações quanto ao conteúdo de carotenóides nos frutos destes acessos, contribuindo para o levantamento das potencialidades nutracêuticas e oferecendo suporte aos programas de melhoramento genético deste gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Quinze acessos de quatro espécies de *Capsicum* (Tabelas 1 e 2) foram selecionados no banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças, com base nas diferentes cores do fruto quando maduro (variando do amarelo pálido ao vermelho intenso). Estes acessos foram cultivados em vasos de 5L em condições de casa de vegetação em Brasília –DF, durante o período de janeiro a agosto de 2009. Foram coletados, no mínimo, três frutos de cada acesso/espécie. As sementes foram removidas. Dez gramas de tecido do pericarpo do fruto foram homogeneizadas e o método de extração empregado foi essencialmente o mesmo descrito por Rodriguez-Amaya (2001). Para a extração dos carotenóides do tecido homogeneizado foi adicionado 40 mL de acetona, seguido de uma homogeneização, utilizando-se um extrator (Polytron). Este processo foi realizado de maneira seqüencial até a obtenção de uma completa extração dos carotenóides da matriz (confirmada pela ausência de cor no tecido). Cada

repetição foi seguida de uma filtração a vácuo (com o auxílio de um 'kitassato') em ambiente com pouca iluminação para evitar a foto-oxidação dos pigmentos. A partição dos carotenóides foi feita pelo uso de 40 ml de éter de petróleo adicionado ao extrato em um funil de decantação. Os pigmentos foram transferidos da acetona para o éter de petróleo através de pequenas frações seguidas de água destilada, descartando-se a fase inferior até a total remoção da acetona. A solução dos pigmentos em éter de petróleo foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, passando por um filtro contendo sulfato de sódio como material higroscópico, para retirada do excesso de água do material. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância através de um espectrofotômetro UV/visível a 451 nm, sendo posteriormente, a amostra, evaporada em um evaporador rotatório. Para análise via CLAE, Os carotenóides foram redissolvidos em 2 mL de acetona grau CLAE. Após filtração em um filtro hidrofóbico (Millex – FH – Millipore, PTFE, 0,45 mm), uma amostra de 10 mL desta solução foi imediatamente injetada no cromatógrafo. O método de análise foi conduzido de acordo com o procedimento descrito por Rodriguez-Amaya (2001). Na análise por CLAE, a separação foi feita de forma isocrática em uma coluna monomérica C18 (Waters ODS2) de fase reversa 3 mm, 4.6 x 150 mm. A fase móvel era composta por 80% de acetonitrila : 10% de metanol : 10% de acetato de etila com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. O sistema CLAE foi constituído de um computador com sistema de dados (LC Solucion-Shimadzu), um auto-injetor de amostra e um detector visível/ultravioleta com arranjo de fotodiodo (Shimadzu).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos maduros de diferentes acessos de *Capsicum* apresentaram uma grande diversidade de cores incluindo: amarela, laranja, marrom e vermelha. Os teores e tipos de carotenóides analisados via CLAE e espectrofotometria estão apresentados na Figura 1. Os acessos de *Capsicum* com coloração vermelha e laranja apresentaram um maior nível de carotenóides totais, sendo que as cultivares de coloração amarela foram as que apresentaram menor quantidade de carotenóides totais. Diferenças estatísticas (Tuckey 5%) foram observadas entre os acessos quanto ao teores de carotenóides totais. O acesso *C. annuum* 'CNPH 0181' (fruto amarelo) foi o que apresentou a menor quantidade de carotenóides totais (67,38 mg/g), não diferindo dos acessos 'CNPH 0645' (amarelo); 'CNPH 1363' (vermelho); 'CNPH 1364' (vermelho); 'CNPH 2850' (vermelho); 'CNPH 0992' (laranja); 'CNPH 0434' (vermelho) e 'CNPH 3017' (laranja). O acesso que apresentou maior quantidade de carotenóides totais foi *C. chinense* 'CNPH 0679' (1995,37 mg/g).

Este acesso apresenta frutos maduros de coloração marrom chocolate. Estes resultados estão de acordo com o de Ha *et. al.* (2007) que analisando frutos de diferentes coloração e em diferentes estágios de amadurecimento, verificou maior nível de carotenóides em frutos vermelhos em comparação com frutos não vermelhos, No entanto, nossos resultados foram diferentes em relação aos frutos laranjas em que foram detectados níveis maiores quando comparados com acessos de fruto maduro de coloração amarela. Os acessos de frutos amarelos apresentaram maior quantidade dos pigmentos luteína e violaxantina. Os acessos de coloração alaranjada apresentaram como principal pigmento o a-caroteno. Os frutos vermelhos apresentaram capsantina/capsorubina como os principais pigmentos.

Uma exceção foi o acesso 'Majjorca' que apresentou uma maior quantidade de b-caroteno em relação à capsantina/capsorubina. O acesso de *C. chinense* 'CNPH 0679' foi o único que acumulou clorofila no fruto maduro. A diversidade de pigmentos encontrada indica que é possível melhorar a qualidade dos frutos de *Capsicum* combinando carotenóides com diferentes funções nutracêuticas.

REFERÊNCIAS

- HA S-H; KIM J-B; PARK J-S; LEE S-W; CHO K-J 2007. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58: 3135 - 3144.
- GIULIANO G; AL-BABILI S; VON LINTIG J. 2003. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends in Plant Sciences* 8: 145-149.
- RODRIGUEZ-AMAYA DB. 2001. A Guide to Carotenoids Analysis in Food. Washington: *International Life Sciences Institute Press*, 64p.
- SMIDT CR; BURKE DS. 2004. Nutritional significance and measurement of carotenoids. *Current Topics in Nutraceutical Research* 2: 79-91.
- REIFSCHNEIDER, FJB. 2000. *Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 113 pp.

Tabela 1. Identificação e características de coloração de fruto do banco de germoplasma de *Capsicum* utilizado neste estudo. Embrapa-Hortaliças, Brasília, 2010.

Acessos	Espécie de <i>Capsicum</i>	Cor do fruto maduro
CNPH 0189	<i>C. annum</i>	Vermelho
Majjorca	<i>C. annum</i>	Vermelho
CNPH 0148	<i>C. annum</i>	Vermelho
CNPH 0181	<i>C. annum</i>	Amarelo
CNPH 0183	<i>C. annum</i>	Vermelho
CNPH 0645	<i>C. annum</i>	Amarelo
CNPH 0679	<i>C. chinense</i>	Marrom (chocolate)
CNPH 2850	<i>C. chinense</i>	Vermelho
CNPH 0434	<i>C. chinense</i>	Vermelho
CNPH 1397	<i>C. baccatum</i>	Vermelho escuro
CNPH 1363	<i>C. baccatum</i>	Vermelho
CNPH 1364	<i>C. baccatum</i>	Vermelho
CNPH 0992	<i>C. baccatum</i>	Laranja
CNPH 3017	<i>C. baccatum</i>	Laranja
CNPH 0279	<i>C. baccatum</i>	Laranja

Tabela 2. Quantidade individual de carotenóides (mg/g de massa fresca). Carotenoid type and content (mg/g fresh tissue). Embrapa-Hortaliças, Brasília, 2010.

CAROTENÓIDES	CNPH 645	CNPH 181	CNPH 3017	CNPH 992	CNPH 279	CNPH 183	CNPH 189	CNPH 148	MAJJORCA	CNPH 2850	CNPH 434	CNPH 1364	CNPH 1363	CNPH 1397	CNPH 679
ANTHERAXANTINA															
NEOXANTINA	20,95 ± 5,92					7,27 ± 0,50									
VIOLAXANTINA	10,32 ± 4,11	9,73 ± 0,67	6,18 ± 1,40		22,47 ± 1,44	8,96 ± 1,50					8,20 ± 1,61				22,47 ± 3,79
CAPSANTINA	46,91 ± 31,09	13,88 ± 1,27			186,90 ± 19,46	18,88 ± 2,37	289,76 ± 19,35	255,72 ± 74,27	145,80 ± 117,41	122,13 ± 26,37	163,03 ± 53,78	114,09 ± 37,21	70,78 ± 20,12	316,98 ± 34,80	302,47 ± 72,51
LUTEINA						18,88 ± 2,37	61,06 ± 29,94	28,18 ± 3,42	28,80 ± 9,54	20,47 ± 7,70	9,74 ± 4,88				13,33 ± 1,97
ZEAXANTINA						3,71 ± 1,87	9,11 ± 2,14	5,43 ± 0,74	8,59 ± 2,17	2,67 ± 1,65	2,91 ± 2,35	3,13 ± 2,32	3,50 ± 0,28	3,41 ± 0,48	38,38 ± 2,59
B-CRIFTOXANTINA						2,22 ± 1,18		13,24 ± 5,29	25,25 ± 9,20	5,44 ± 2,93	18,59 ± 4,88	7,13 ± 2,06	0,63 ± 0,44	6,81 ± 1,23	18,83 ± 0,61
A-CRIFTOXANTINA						11,61 ± 1,33		10,07 ± 2,17	4,49 ± 4,49	0,96 ± 0,96	2,31 ± 0,31	2,64 ± 0,78	0,86 ± 0,43	3,00 ± 0,37	6,92 ± 0,36
A-CAROTENO	9,51 ± 6,17		129,99 ± 19,38	105,21 ± 7,81	200,74 ± 31,02	17,17 ± 2,36	12,91 ± 6,46	19,14 ± 7,14	16,05 ± 16,05	6,96 ± 5,46	14,00 ± 3,72	4,77 ± 4,77			38,48 ± 2,48
B-CAROTENO	5,27 ± 2,48		55,93 ± 4,49	32,89 ± 2,17	72,09 ± 9,88	96,75 ± 6,76	117,27 ± 57,69	81,42 ± 34,24	262,34 ± 114,69	44,44 ± 9,36	52,87 ± 14,25	32,31 ± 12,45	5,62 ± 0,91	53,34 ± 11,58	244,88 ± 31,78
CLOROFILA															109,78 ± 4,50
OUTROS	49,77 ± 12,98	43,68 ± 2,03	134,79 ± 23,51	181,60 ± 1,94	270,55 ± 51,92	85,83 ± 16,54	165,53 ± 55,62	169,84 ± 13,26	295,72 ± 147,42	104,03 ± 8,29	89,46 ± 19,57	114,73 ± 39,31	81,48 ± 5,85	188,73 ± 25,40	508,75 ± 14,17
CAROTENÓIDES															

Avaliação via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do perfil de carotenóides em acessos de quatro espécies de *Capsicum*.

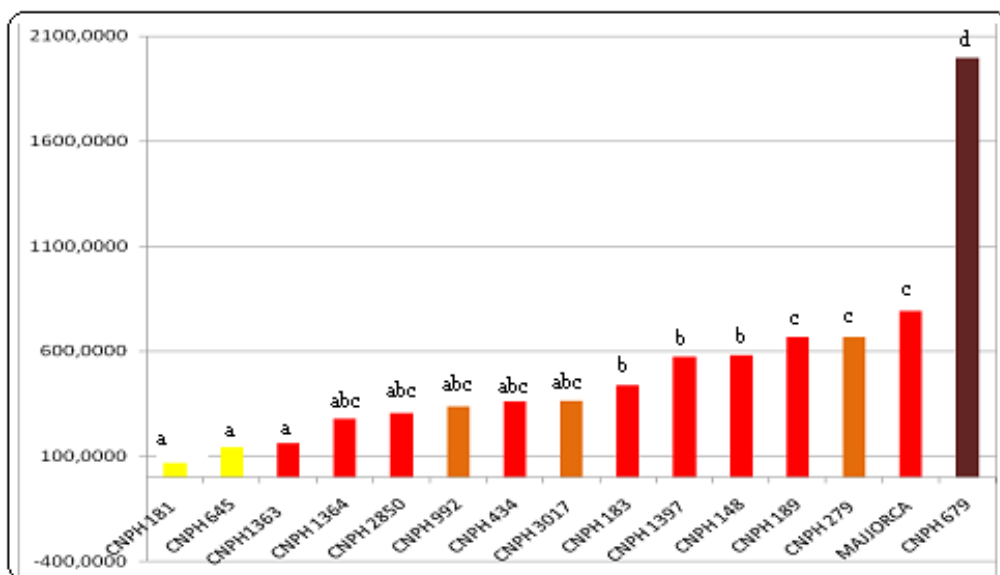


Figura 1. Carotenóides totais em *Capsicum* (mg/g de peso fresco). Letras diferentes no alto das colunas indicam que os acessos são diferentes para esta característica (Tuckey a 5% de probabilidade). Embrapa-Hortaliças, Brasília, 2010.

