

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS EM FRUTOS DE PIMENTA
SUBMETIDOS A REGULADORES VEGETAIS**

GILVANDA LEÃO DOS ANJOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
OUTUBRO - 2019**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM FRUTOS DE PIMENTA SUBMETIDOS A
REGULADORES VEGETAIS**

GILVANDA LEÃO DOS ANJOS

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias.
(Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

OUTUBRO - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A599o	<p data-bbox="528 1198 1264 1388">Anjos, Gilvanda Leão dos. Otimização da extração e avaliação de compostos fenólicos em frutos de pimenta submetidos a reguladores vegetais / Gilvanda Leão dos Anjos._ Cruz das Almas, BA, 2019. 85f.; il.</p> <p data-bbox="580 1422 995 1451">Orientador: Fabio de Souza Dias.</p> <p data-bbox="528 1485 1264 1579">Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.</p> <p data-bbox="528 1612 1264 1738">1.Pimenta – Regulador de crescimento. 2.Pimenta – Compostos fenólicos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p data-bbox="890 1771 1037 1798">CDD: 635.1</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM FRUTOS DE PIMENTA SUBMETIDOS A
REGULADORES VEGETAIS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE GILVANDA LEÃO DOS ANJOS**

Realizada em 26 de julho de 2019

Prof. Dr. Fabio de Souza Dias
Universidade Federal da Bahia-UFBA
Examinador interno (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Alan Couto dos Santos
Instituto Federal da Bahia
Examinador interno

Prof.^a Dr.^a Franceli da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB
Examinadora interna

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família, que sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela presença constante durante toda a minha caminhada; aos meus pais o Sr. Gilvando e a Sra. Rosimeire por terem acreditado em mim e estado presente em todos os momentos; a minha irmã Taniele; a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram de forma positiva nessa jornada.

Agradeço ao meu orientador professor Fabio de Souza Dias, por tudo que aprendi durante esses 2 anos e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho; a Gisele, Candice e Angélica pela ajuda, apoio e amizade durante a execução do projeto; ao pessoal do Grupo de Pesquisa Manejo de Nutrientes no Solo e em Plantas Cultivadas pela ajuda e amizade, principalmente Janildes, Patrícia e Railda; ao técnico Fabrício, pela ajuda com o HPLC; aos colegas do grupo LAIA, que tornaram a convivência no laboratório prazerosa; ao professor Anacleto e Girlene, pelo auxílio; aos funcionários da Fazenda Experimental, por toda prestatividade durante a execução do projeto.

A CNPq, pelo financiamento do projeto.

Obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
ARTIGO 1	
OTIMIZAÇÃO DE PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM <i>Capsicum</i> <i>frutescens</i>	26
ARTIGO 2	
INFLUÊNCIA DE REGULADORES VEGETAIS NA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM FRUTOS DE PIMENTA MALAGUETA.....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
ANEXO.....	75

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM FRUTOS DE PIMENTA SUBMETIDOS A REGULADORES VEGETAIS

Autora: Gilvanda Leão dos Anjos

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Resumo: A pimenta 'Malagueta' é muito valorizada pela sua pungência e nutrição, além de ser fonte de compostos fenólicos. Vários fatores afetam a produção de fenólicos na planta, e dentre eles os reguladores vegetais. Para extrair o máximo desses compostos na amostra é utilizado ferramentas estatísticas que possibilitam otimizar o processo de extração, determinando-se as condições ótimas. Objetivou-se otimizar um processo de extração de compostos fenólicos em *Capsicum frutescens* e avaliar os compostos fenólicos destas plantas quando submetidas a reguladores vegetais. No primeiro capítulo foi otimizado a solução extratora e as melhores condições de extração em banho ultrassônico utilizando um planejamento Box-Benhker junto com a função de desejabilidade. A melhor composição de mistura foi 93% de metanol e 7% de água e as melhores condições experimentais para extração mediada por ultrassom, foram 16 mL, 45 minutos e 40 °C para folha e 16 mL, 19,5 minutos e 53 °C para fruto. Já no segundo capítulo foram cultivadas pimenteiras em casa de vegetação, onde foram aplicados quatro tratamentos: testemunha (sem reguladores), 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ABA, 144 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GA_3 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, e após coletar, secar e triturar os frutos, foram determinados os compostos fenólicos. Foram identificados doze compostos fenólicos nas amostras de fruto. Para fenólicos e flavonoides totais, o ABA se diferenciou da testemunha e o AS não se diferenciou. Houve aumento na síntese de ácido gálico, catequina, ácido *trans*-cinâmico e ácido ferúlico com aplicação de GA_3 e AS. A aplicação de reguladores vegetais influencia na síntese de fenólicos em frutos de *C. frutescens*.

Palavras-chave: Bioativos, fitorreguladores, ultrassom.

OPTIMIZATION AND EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION IN FRUITS OF PEPPER SUBMITTED TO PLANT GROWTH REGULATORS

Author: Gilvanda Leão dos Anjos
Advisor: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Abstract: The 'Malagueta' pepper is highly valued for its pungency and nutrition, in addition to being a source of phenolic compounds. Several factors affect the phenolic compounds production in plants, and among them the plant growth regulators. To extract the maximum amount of these compounds in the sample is used statistical tools to optimize the extraction process, determining the optimal conditions. This study aimed to optimize a phenolic compounds extraction process in *Capsicum frutescens* and evaluate the phenolic compounds of these plants when submitted to regulators. The first chapter contains an optimization for the stripper solution and the best extraction conditions for the ultrasonic bath using a Box-Benhker planning along with the desirability function. The best mixture composition was 93% methanol and 7% water and the best experimental conditions for the ultrasound assisted extraction were 16 mL, 45 minutes and 40°C for the leaves and 16 mL, 19.5 minutes and 53°C for the fruits. In the second chapter, pepper plants were grown in a greenhouse, where four treatments were applied: control (without growth regulators), 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of ABA, 144 $\mu\text{mol L}^{-1}$ GA₃ and 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SA, and after collecting, drying and grinding the fruits, the phenolic composition was determined. Twelve phenolic compounds were identified in fruit samples. The phenolics and total flavonoids, analysis showed that ABA differed from the control, while SA did not differ. There was an increase in the synthesis of gallic acid, catechin, *trans*-cinnamic acid and ferulic acid with application of GA₃ and SA. The application of plant regulators influences the synthesis of phenolic compounds in fruits of *C. frutescens*.

Keywords: Bioactive, phyto regulators, ultrasound.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. *Capsicum frutescens*

1.1. Importância econômica

As plantas do gênero *Capsicum* estão entre as mais antigas cultivadas no mundo (GURNANI et al., 2016). São originárias da América Central e do Sul e são conhecidas desde os tempos pré-colombianos (IBIZA et al., 2012). O gênero é consumido em todo o mundo *in natura* e/ou em produtos como páprica, pasta, frutos desidratados ou em conservas e como plantas ornamentais (SRICHAROEN et al., 2017), exigindo maior área de cultivo e aumento das agroindústrias, levando a cadeia produtiva das pimentas a se tornar uma grande parte do comércio hortícola no Brasil (LOPES, 2007). Em 2016, a produção mundial de pimentão e pimenta foi de 34,5 milhões toneladas (MT) (ZHANG et al., 2018). A China produziu 17,5 MT, México 2,7 MT, Indonésia 2,0 MT e Espanha 1,1 MT, sendo estes países responsáveis pela maior parte da produção mundial de pimenta fresca, e a Índia foi o maior produtor de pimentas secas (1,4 MT) (BAENAS et al., 2018).

A produção de pimenta vem aumentando nos últimos tempos no território brasileiro, sendo que o cultivo ocorre tanto no Sul do país (clima subtropical) como no Norte e Nordeste (clima tropical). Essa cultura tem importância econômica, por sua rentabilidade (RUFINO e PENTEADO, 2006) e importância social, empregando elevado número de mão-de-obra, principalmente na colheita (PINTO et al., 2010).

Existem vários tipos de pimentas, de diferentes formas, cores e ardor. A 'Malagueta' é cultivada em todo o Brasil, contudo os estados de Minas Gerais, Bahia e Ceará se destacam no cultivo dessa variedade (RUFINO e PENTEADO, 2006).

Em algumas cidades brasileiras não é muito comum encontrar pimentas no estado *in natura* no comércio, devido aos hábitos alimentares dos consumidores. Na região Sul o consumo das pimentas é na forma de molhos, conservas e desidratadas. Na região Sudeste são consumidas principalmente a pimenta doce

do tipo americana, 'Cambuci', 'Malagueta' e 'Cumari Vermelha'. Os consumidores do Nordeste preferem a 'Malagueta' e 'De Cheiro'. Já no Norte, são mais consumidas a 'Murupi', 'Cumari do Pará' e a 'De Cheiro'. No Centro-Oeste, é tradição o cultivo e consumo das pimentas 'Bode', 'Malagueta', 'Cumari do Pará' e 'Dedo de Moça' (LOPES, 2007).

1.2. Botânica

As plantas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae. Atualmente, acredita-se que este gênero consista em 27 espécies (IBIZA et al., 2012) que são agrupadas em três categorias de acordo com o nível de exploração pelo homem: domesticadas (largamente cultivadas), semidomesticadas (pouco cultivadas) e silvestres (não cultivadas comercialmente) (CARVALHO, 2006). Cinco dessas espécies, *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., e *Capsicum baccatum* L. (YAMAMOTO e NAWATA, 2005) são domesticadas e consumidas na forma *in natura* ou como temperos, junto com aproximadamente 3000 variedades (IBIZA et al., 2012).

A *Capsicum frutescens* L. conhecida popularmente como pimenta 'Malagueta', é um arbusto perene com caule semi-lenhoso, sua altura varia entre 1,5 a 2,0 m em função das condições climáticas e de cultivo. As folhas são cerosas e medem 6 cm de comprimento, apresentam ramificações laterais amplas com o sistema radicular pivotante. As flores são autógamas e solitárias, em cada nó possui pedicelos eretos na antese, corola branca esverdeada, sem manchas e, geralmente, os lobos dobram-se para trás. As anteras são geralmente azuis, roxas ou violetas. Os frutos são cônicos e eretos e medem entre 0,6 e 4 cm de comprimento. Eles são de cor verde ou amarelo no estado imaturo e de cor vermelho no estado maduro (Figura 1). O fruto possui polpa mole e a semente é de cor palha a dourada, lisa e mais reta e espessa no hilo (YAMAMOTO e NAWATA, 2005; CARVALHO, 2006).



Figura 1 – Flores (a) e frutos (b) das pimentas *Capsicum frutescens*.

Fonte: Carvalho (2006).

1.3. Valor nutricional e medicinal

A pimenta 'Malagueta' é geralmente muito picante (YAMAMOTO e NAWATA, 2005). Em vários locais do mundo, ela é muito valorizada pela sua pungência, nutrição e conteúdo de pigmentos dos frutos (TIAN et al., 2014).

As pimentas são importantes devido as suas características sensoriais e por ser fonte de compostos bioativos que proporcionam benefícios para a saúde dos consumidores, incluindo vitaminas C e E, carotenoides e compostos fenólicos (BAENAS et al., 2018). Os teores desses bioativos mudam com os processos metabólicos e químicos das plantas. De acordo com Berke e Shieh (2012) em 100 gramas de pimenta vermelha fresca tem 240 mg de vitamina C, 11 000 UI de vitamina A e 0,7 mg de vitamina E.

O gênero *Capsicum* tem sido usado como medicamento alternativo para o tratamento de inflamações, diabetes, dor lombar e amigdalite aguda (SPILLER et al., 2008). Emplastro dessas plantas tem sido usado na acupuntura coreana para reduzir náusea, vômito e dor de garganta no pós-operatório. A civilização maia utilizava a pimenta para tratar de diversas doenças, como dor de ouvido e cuidados com a pele (GURNANI et al., 2016).

A quantidade de fitoquímicos nas pimentas difere dependendo da parte do fruto (placenta, pericarpo e sementes), da cultivar ou variedade, do estado de maturação, das condições climáticas e de armazenamento, assim como das práticas de processamento (JAYAPRAKASHA et al., 2012).

Os carotenóides são em geral os principais fitoquímicos encontrados nas variedades de pimenta, que acrescentam alto valor comercial a esses frutos em relação à cor e propriedades antioxidantes (BAENAS et al., 2018), podendo prevenir doenças cardiovasculares, câncer e degeneração macular (GIUFFRIDA et al., 2013). Os carotenóides principais e exclusivos da pimenta são a capsantina e seu isômero capsorubina, que compõe 30-60% e 6-18%, respectivamente, do total presente no fruto. São muito utilizados para fins cosméticos, devido a seus atributos de coloração (DENG et al., 2017). A intensidade da cor vermelha em uma pimenta está relacionada à quantidade destes pigmentos (BERKE e SHIEH, 2012).

Os capsaicinóides são alcaloides responsáveis pela pungência dos frutos de *C. frutescens*, conhecidos por seus efeitos farmacológicos, neurológicos e dietéticos. Essas substâncias têm atividade antibiótica significativa e a capacidade de reduzir os níveis de colesterol no sangue quando usadas em quantidades baixas na alimentação regularmente (GURNANI et al., 2016). Por causa de sua atividade analgésica e anti-inflamatória, a capsaicina tem sido utilizada na prática clínica. Segundo Spiller et al. (2008), a aplicação da capsaicina diretamente na pele tem um valor terapêutico em muitas condições de dor neuropática, incluindo artrite reumatóide, osteoartrite, neuropatia diabética, síndrome de dorosa pós-mastectomia, psoríase e herpes zoster.

As pimentas possuem grandes quantidades de compostos fenólicos, especialmente flavonoides e derivados do ácido fenólico, contribuindo para a dieta humana (JAYAPRAKASHA et al., 2012). Eles colaboram para o sabor e cor dos frutos e apresentam efeitos terapêuticos devido às propriedades antioxidantes (PADILHA et al., 2015). Aguiar et al. (2019) encontraram dezesseis compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, flavonoides e glicosídeos) em extratos de *Capsicum chinense*. Quatro flavonoides foram quantificados em amostras de *Capsicum annum*: vitexina, isoquercetina, kaempferol-3-glicosídeo e miricetina (MARINCAŞ et al., 2018). Bae et al. (2012) quantificaram em

amostras de *C. annuum* L. cv. 'CA377' e *C. chinense* L. cv. 'TMH' cinco flavonoides: quercetina, luteolina, apigenina, miricetina e kaempferol.

As pimentas são importantes devido ao seu conteúdo em compostos bioativos, fazendo-se necessário uma atenção especial na caracterização e exploração desses produtos vegetais com usos múltiplos (BAENAS et al., 2018).

2. Compostos fenólicos

A produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) é muito comum em todos os seres aeróbios. As ERO são resultantes de etapas sucessivas de um elétron na redução do oxigênio molecular (GAYOSO et al., 2004).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou prevenir a oxidação de moléculas essenciais aos seres humanos, como lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, inibindo as reações em cadeia oxidantes causadas por ERO e, portanto, podem reduzir o dano oxidativo ao corpo humano, como inflamação, doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento (KHANAM et al., 2012; FREIRE et al., 2013). Atualmente, os antioxidantes naturais, principalmente os presentes em frutas e legumes, ganharam atenção de estudiosos e consumidores. Os três principais grupos disponíveis em frutas e vegetais são as vitaminas, os compostos fenólicos (Figura 2) e os carotenoides, que estão envolvidos na prevenção de determinadas doenças (THAIPONG et al., 2006).

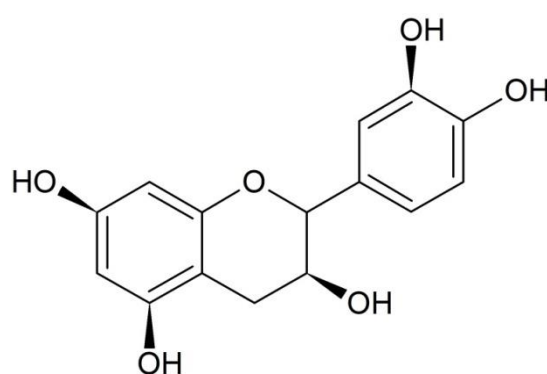


Figura 2 – Estrutura química do Flavan-3-ol.

Substâncias fenólicas são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, que podem ser categorizados em fenóis simples, ácidos fenólicos,

flavonoides, ligninas e taninos. Além das propriedades antioxidantes, essas substâncias são responsáveis pelas características organolépticas das pimentas (KARTIKA et al., 2007). Os fenólicos são constituídos por um anel benzênico tendo um ou mais grupos hidroxila ligados. Por serem mais ácidos que os álcoois são mais facilmente oxidados. Essa classe possui compostos solúveis em água e solventes orgânicos, os caracterizando como moléculas heterogêneas (ASHRAF et al., 2018).

2.1. Compostos fenólicos nas plantas

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: o primário, que produz metabólitos responsáveis pelo desenvolvimento e sobrevivência do vegetal e o secundário, cujos metabólitos produzidos são utilizados como estratégia de adaptação das plantas com o meio em que estão inseridas. Os compostos fenólicos juntamente com os terpenos e compostos contendo nitrogênio são os principais grupos de metabólitos secundários (TAIZ e ZEIGER, 2017). A presença e a quantidade de metabólitos secundários nos vegetais são dependentes de fatores externos (ambientais) e fatores internos (biológicos) (SYTAR et al., 2018), como o tipo de material vegetal, predisposição genética de espécies de plantas, condições climáticas, composição do solo e estágio vegetativo da planta, entre outros (WEI et al., 2013).

Diversos compostos fenólicos já foram identificados nos vegetais superiores, e boa parte desses são encontrados em plantas comestíveis. Portanto, esses compostos estão presentes em diversas frutas, como limão, laranja, tangerina, uva, cereja, ameixa, pera e maçã (ANGELO e JORGE, 2007), além dos legumes, verduras e bebidas como, por exemplo, o vinho (DALL e ARCHELA, 2014).

Os compostos fenólicos têm funções importantes nos organismos vegetais. Possuem atividade antioxidante, protegem o aparato fotossintético contra a alta radiação solar, servem como pigmentos e co-pigmentos, substratos respiratórios, reguladores endógenos de crescimento e na atração de insetos para dispersão de sementes e polinização (BEREZINA, BRILKINA e VESELOV, 2017) além de serem apontados em muitos papéis ecológicos “secundários”, como interações

moduladoras com insetos e micróbios e seleção de luz ultravioleta (JIANG et al., 2017). De acordo com Sytar et al. (2018) os fenólicos têm papel na proteção contra herbívoros e fitomoléstias. Os flavonoides são importantes em várias funções biológicas, como por exemplo, a quercetina, um dos principais representantes dos flavonoides, previne a oxidação da lipoproteína de baixa densidade ao eliminar os radicais livres (CARTEA et al., 2011).

2.2. Benefícios dos compostos fenólicos à saúde humana

Em células aeróbicas ocorrem processo respiratório e diversas reações oxidativas e como consequência ocorre à formação de radicais livres, que causam efeitos negativos ao organismo e contribuem para o advento de muitas doenças, tais como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, além de acelerarem o processo de envelhecimento (SIKORA et al., 2008). Sendo este o motivo das células humanas necessitarem de certa capacidade antioxidante que combatam os efeitos danosos dos radicais livres. Para uma defesa eficaz, o organismo humano possui mecanismo de defesa, que consiste em enzimas: dismutase superóxido, redutases ascorbato, peroxidases e catalases, além de componentes lipossolúveis (vitamina E; carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico; glutatona) (SILVA et al., 2010).

Em frutas, legumes e verduras estão presentes compostos antioxidantes, sendo que a ingestão desses alimentos pode reduzir a mortalidade e morbidade, causadas por doenças crônicas. Os compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides representam uma parte desses antioxidantes, eles estão presentes em diferentes concentrações nos frutos. (FREIRE et al., 2013). Os compostos fenólicos podem prevenir doenças crônicas, como o câncer, diabete, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e aterosclerose (SANTOS et al., 2014). E os mais recorrentes na alimentação humana são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos (DALL e ARCHELA, 2014).

Atualmente há uma forte tendência na utilização de extratos vegetais como ingredientes em alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. A adição de extratos em produtos da indústria de alimentos pode convertê-los em produtos alimentícios de alta qualidade e funcionalidade, pois, além de satisfazer

as necessidades nutricionais, proporcionam efeitos benéficos para a saúde tornando-os importantes para o homem moderno na prevenção de várias doenças. Cada vez mais os compostos bioativos naturais e os extratos herbários substituem os antioxidantes sintéticos, uma vez que os compostos fenólicos dentro deles são antioxidantes extremamente eficientes e muito utilizados como ingredientes bioativos de alta qualidade nos produtos alimentícios funcionais (CVETKOVIĆ et al., 2018).

3. Ação dos reguladores vegetais no metabolismo das plantas

Os fitormônios atuam como mensageiros químicos para sinalizar atividades celulares em plantas superiores. Eles desempenham papéis essenciais e coordenam diversas vias de transdução de sinal durante as respostas aos estresses abióticos (WANI et al., 2016). Um mesmo hormônio pode estar envolvido em diferentes processos, dependendo de sua concentração, podendo ser tanto estimulador quanto inibidor (OCHOA-VELASCO et al., 2017).

O primeiro local de ação dos fitormônios é na membrana plasmática, o mesmo se uni as proteínas receptoras ativando enzimas que levam a liberação de Ca^{2+} para o citosol e a ativação da proteína quinase, essa pode formar um complexo que ativa várias enzimas que transferem o excesso de Ca^{2+} do citosol para fora da célula, sendo parte armazenada no vacúolo, ocorrendo liberação de H^+ para a parede celular, causando acidificação da mesma, essa acidificação ativa enzimas que agem na parede das células, elevando sua plasticidade, favorecendo a entrada de água e promovendo o alongamento celular (VIEIRA et al., 2010).

Fitormônios são moléculas orgânicas produzidas naturalmente pelos vegetais, atuam dentro das células em pequenas concentrações alterando o crescimento e desenvolvimento das plantas (GIANNAKOULA et al., 2012). Já os reguladores de crescimento vegetal são substâncias que aplicadas exógenamente produzem efeitos semelhantes aos dos fitormônios. Estes fitormônios incluem as auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas, etileno, jasmonatos e brassinosteroides (VIEIRA et al., 2010).

Os reguladores vegetais desempenham um papel crucial na coordenação do crescimento e desenvolvimento em toda uma gama de processos, incluindo divisão, diferenciação e expansão celular, organogênese e germinação. Eles são muito utilizados na agricultura para aumentar o crescimento e a reprodução das plantas, em várias culturas, como árvores frutíferas (LIU et al., 2016).

O conhecimento sobre os efeitos fisiológicos dos diferentes fitormônios é imprescindível para estudos que objetivam modificar respostas fisiológicas das plantas, por meio da aplicação de reguladores vegetais (VIEIRA et al., 2010).

3.1. Giberelinas

No início dos anos 70 a China conseguiu sintetizar e produzir industrialmente a giberelina. Foi quando o ácido giberélico (GA₃) começou a ser amplamente utilizado no cultivo de olerícolas comerciais como regulador vegetal para melhorar o crescimento das plantas (BOSE et al., 2013). As giberelinas (GAs) são sintetizadas a partir de unidades de acetato da acetil-CoA utilizando uma rota sintética a partir do ácido mevalônico, que são compostos isoprenóides, especificamente diterpenos. Na natureza é possível encontrar um grande número de GAs, mas apenas algumas delas são biologicamente ativas, como GA₁, GA₃ (Figura 3), GA₄ e GA₇ (SALEH e EL-SOUD, 2015; WANI et al., 2016).

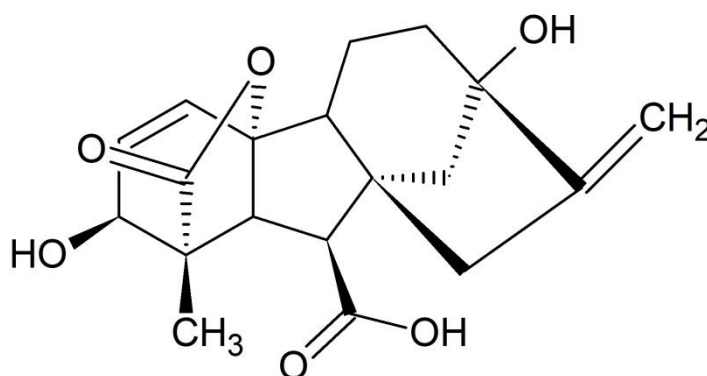


Figura 3 – Estrutura química do GA₃.

Os reguladores de crescimento estão sendo largamente utilizados a fim de aumentar a produção agrícola. Há muitos trabalhos na literatura demonstrando que a aplicação de reguladores vegetais melhora o crescimento das plantas e o

rendimento das culturas. As GAs são conhecidas como promotores de crescimento que regulam muitas respostas nos vegetais, como germinação de sementes, retardamento da senescência (GIANNAKOULA et al., 2012), alongamento de células e órgãos, bem como floração e tem amplas aplicações na agricultura moderna (SALEH e EL-SOUD, 2015).

Recentemente alguns estudos têm demonstrado que a giberelina exógena influencia no metabolismo secundário das plantas. Alrashdi et al. (2017) estudando o efeito da aplicação de ácido salicílico e ácido giberélico na qualidade da baga, compostos antioxidantes, capacidade antioxidante e atividade enzimática de uvas de mesa cultivar 'El-Bayadi', obtiveram aumento do peso, comprimento e a largura das bagas de uva pulverizadas com GA₃, e aumento na concentração de fenóis e flavonoides totais com os tratamentos ácido salicílico e GA₃.

Em frutos de ameixeira japonesa a aplicação de GA₃ intensificou a cor dos frutos, o conteúdo de solúveis totais e a firmeza dos frutos, mas reduziu a atividade antioxidante e não influenciou no conteúdo de fenólicos (EROGUL e SEM, 2015). Em frutos de pimenta verde, GA₃ provocou um atraso significativo na mudança da cor da casca, declínio na acidez titulável, conteúdo total de ácido fenólico e ascórbico, aumento nas atividades enzimáticas e antioxidantes durante o armazenamento refrigerado em comparação com os frutos controle (PANIGRAHI et al., 2017). Em plantas de *Calendula officinalis* a pulverização com GA₃, aumentou a concentração dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante (SARDOEI et al., 2014).

3.2. Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) (Figura 4) deve seu nome ao seu papel na abscisão das folhas de plantas. É possivelmente o hormônio mais estudado por seu papel na adaptação de plantas aos estresses abióticos, por isso ele também é conhecido como o "hormônio do estresse". É um isoprenóide produzido na via plastidal 2-C metil-D-eritritol-4-fosfato (SREENIVASULU et al., 2010).

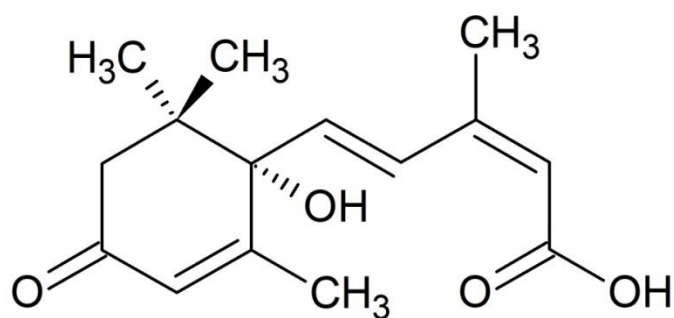


Figura 4 – Estrutura química do ABA.

O ABA regula as respostas de vários processos fisiológicos e fases de desenvolvimento dos vegetais, como a manutenção da dormência de sementes, inibição de germinação, regulação do crescimento, abertura e fechamento estomático, morfogênese do embrião e síntese de proteínas e lipídios de armazenamento, abscisão de frutos, além de mediar as respostas aos estresses abiótico e biótico (LI et al., 2010; SREENIVASULU et al., 2010).

Jamalian, Gholami e Esna–Ashari (2013) confirmam o papel efetivo do ABA na produção de compostos fenólicos e na ativação do mecanismo de defesa antioxidante. As respostas provocadas pela aplicação do ABA podem ocorrer em todos os órgãos, modificando não só o metabolismo secundário, como também o metabolismo primário (MURCIA et al., 2017).

Alonso et al. (2016) verificaram que duas aplicações de ABA em uva Malbec (*Vitis vinifera* L.) foram suficientes para induzir alterações bioquímicas, aumentando as antocianinas totais, especialmente aquelas com maior capacidade antioxidante. Em plantas de uva cv Carménère houve aumento concomitante de flavonóis nas bagas 40 dias após o amadurecimento, e isso ocorreu em maior escala em bagas tratadas com a maior concentração de ABA (VILLALOBOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

Ferrara et al. (2015) obtiveram com a aplicação de ABA, uma melhor cor das bagas de uva e aumento na quantidade de cachos bons para a colheita na primeira escolha (80-95%) em comparação com o tratamento controle (43%), além do aumento da concentração de antocianinas e efeito positivo sobre a atividade antioxidante.

4. Ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) (Figura 5) é um composto fenólico que ocorre naturalmente nos vegetais e é responsável pela regulação da expressão protéica associada à patogênese (MIURA e TADA, 2014). A síntese de AS ocorre por meio de duas vias: o isochorismato e a via da fenilalanina amônia-liase (WANI et al., 2016). Além das respostas de defesa, desempenha um papel essencial na regulação do crescimento, amadurecimento e desenvolvimento das plantas, bem como nas respostas aos estresses abióticos (RIVAS-SAN VICENTE e PLASENCIA, 2011).

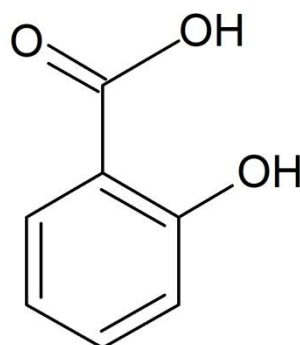


Figura 5 – Estrutura química do AS.

Acredita-se que em baixas concentrações de AS, pode ocorrer aumento da capacidade antioxidante dos vegetais, mas em altas concentrações causam morte celular ou sensibilidade a estresses abióticos (WANI et al., 2016).

Em plantas de milho, observou-se que o AS com ou sem herbicida, induziu o acúmulo de fenólicos, sendo que quanto maior o conteúdo fenólico total da planta, maior a capacidade antioxidante total (RADWAN, 2012). Pérez-Tortosa et al. (2012) estudando *Thymus membranaceus* tratados com AS obtiveram com uma única aplicação de ácido salicílico ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) um aumento nos níveis de fenólicos, o que, por sua vez, melhorou as propriedades antioxidantes dos extratos da planta.

O AS e metil jasmonato alteraram a composição da hemicelulose de *Brachypodium distachyon*, onde foram detectados aumentos do ácido caféico, ácido ferúlico e conteúdo de ácido *p*-cumárico (NAPOLEÃO et al., 2017). Em *Matricaria chamomilla* o AS e o ditiotreitól estimularam o aumento nos

ácidos fenólicos da parte aérea, mas diminuíram os níveis de compostos relacionados à cumarina (KOVÁČIK et al., 2012).

5. Extração de compostos fenólicos em amostras vegetais

O método de extração ou método de preparação da amostra deve ser cuidadosamente pensado e executado para assegurar um isolado bem-sucedido dos compostos de interesse. A etapa de extração é um passo crítico na determinação de bioativos em plantas (ZHANG, LIN e YE, 2018), compondo mais de 60% do tempo total, enquanto menos de 7% envolve a etapa de identificação e quantificação. A seleção de um método de extração apropriado é importante, pois, caso contrário pode haver destruição ou perda do analito durante essa etapa resultando assim numa interpretação equivocada do resultado (YAHYA, ATTAN e WAHAB, 2018).

Vários fatores (tempo, temperatura de extração e solvente) influenciam na extração de compostos bioativos, sendo o tipo de solvente um fator importante, já que cada solvente apresenta propriedades químicas diferentes, assim, como os compostos fenólicos (MELO et al., 2008). Há ampla quantidade de compostos bioativos nas plantas, tanto na forma livre, quanto conjugada com carboidratos, proteínas e outras biomoléculas (ANDREO e JORGE, 2006). Para separar completamente o analito da matriz da amostra, os solventes utilizados devem ter afinidade com os compostos de interesse (YAHYA, ATTAN e WAHAB, 2018). Segundo Sahin e Samli (2013) a água é um solvente muito utilizado na extração de bioativos, porém, possui alta viscosidade, por isso é associado a outros solventes de baixa viscosidade, como o etanol, permitindo que o solvente penetre completamente nas folhas. A partir da seleção da melhor composição da mistura extratora é possível obter uma combinação de solventes com polaridade adequada para extrair compostos fenólicos com graus de polaridade diferentes (GARCIA-SALAS et al., 2010).

Além da solução extratora, a escolha do método de extração é muito importante, sendo que existem diversos métodos. A extração de soxhlet é um método convencional que combina os benefícios dos processos de extração e percolação de refluxo (ZHANG, LIN e YE, 2018). Existem outros métodos

convencionais de extração como, extração por decocção, extração por solvente, extração por destilação a vapor e a extração por alta pressão hidrostática entre outros. Contudo, os métodos tradicionais possuem as desvantagens de baixa taxa de extração, alto gasto de solvente, grande consumo de energia e tempo. As técnicas mais sofisticadas, como extração por micro-ondas e extração assistida por ultrassom, reduzem esses gastos (WEN et al., 2018).

Na extração assistida por micro-ondas a energia de micro-ondas é fornecida através de interações de componentes polares para gerar calor por conversão de energia eletromagnética em térmica (PIMENTEL-MORAL et al., 2018). Já a extração assistida por ultrassom, envolve a utilização de um ultrassom na faixa de 20-2000 kHz (LIANFU e ZELONG, 2008; DHANANI, et al., 2013). As ondas ultrassônicas produzem bolhas de cavitação, onde nessa região ocorre alta temperatura, pressão e possivelmente gradientes de campo elétrico favorecendo a descamação, erosão e quebra das paredes celulares, ocorrendo à liberação do conteúdo celular, de modo que vários compostos podem ser extraídos das plantas (PICO, 2013.).

A técnica de extração assistida por ultrassom traz vantagens como, o maior rendimento do produto, menor tempo de processamento e custos de manutenção, redução no uso de solventes orgânicos (XIA, SHI e WAN, 2006; LIANFU e ZELONG, 2008; AHMAD-QASEM et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; CHEMAT et al., 2017), além de aumentar o processo de transferência de massa e evitar a destruição dos compostos bioativos. Contudo, fatores como tempo de sonicação, temperatura, volume de solvente e tamanho da partícula afetam a transferência de massa (WEN et al., 2018), ou seja, influenciam na eficiência da extração mediada por ultrassom.

6. Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de fenólicos totais em amostras vegetais é dificultada por vários fatores, como a grande variedade de compostos fenólicos, a complexidade química dos componentes da amostra, a interferência de outros compostos químicos e a dificuldade de extração dos fenólicos da amostra. Geralmente, fenólicos totais são medidas feitas em espectrofotômetro principalmente pelo

método de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu é constituído por sais de tungstênio, molibidênio e outros reagentes (DALL e ARCHELA, 2014). O ensaio Folin-Ciocalteu ou de fenólicos totais é o método mais conhecido de determinação de fenólicos em uma amostra, são muito empregados por serem simples e reprodutivos (VEBER et al., 2015).

Várias técnicas analíticas são utilizadas para possibilitar a separação e identificação dos compostos bioativos presentes em várias amostras vegetais (SAUCEDO-POMPA et al., 2018). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada aos mais diversos detectores é a mais utilizada para a separação e detecção de compostos fenólicos (CONG-CONG et al., 2017).

Moussi et al. (2015) utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (DAD), conseguiram identificar sete compostos fenólicos (rutina, quercetina-3-ramnosídeo, caempferol, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico e luteolina) em extratos de *Rhamnus alaternus*. Em folhas de uva, 13 compostos fenólicos foram identificados usando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detector de arranjo de diodo (ZEB, 2015).

7. Estatística multivariada para a otimização de procedimentos de extração

É comum o uso de metodologia univariada para otimizar as condições de aplicação de um método analítico ou procedimento de extração. Nesse tipo de otimização estuda-se uma variável de cada vez sendo uma abordagem convencional que envolve um número de experimentos sequenciais caros e demorados (alto consumo de tempo e reagentes), além da impossibilidade de avaliar as interações entre as variáveis estudadas. A utilização da otimização multivariada vem ganhando espaço na determinação das melhores condições experimentais dos métodos analíticos (BAS e BOYACI, 2007; KUMAR et al., 2014), pois obtém-se o máximo de informações com um número mínimo de experimentos, variando ao mesmo tempo todos os fatores do processo (VELJKOVIĆ et al., 2018).

Os métodos de otimização multivariada baseiam-se em modelos matemáticos e estatísticos para encontrar condições ótimas de situações que

envolvem muitas variáveis. Desta forma, a escolha e aplicação de um desenho experimental, permite a extração de informações para determinar as condições que proporcionam os melhores resultados na aplicação de procedimentos analíticos (FERREIRA et al., 2007; NOVAES et al., 2016).

O primeiro passo na otimização multivariada é a triagem das variáveis que afetam significativamente as respostas no procedimento analítico (NOVAES et al., 2016). Dois tipos de estratégias multivariadas são muito aplicadas buscando realizar a triagem das variáveis: o planejamento fatorial completo e o fracionário de dois níveis. O número de experimentos que serão utilizados em planejamentos completos é dado pela fórmula n^k , sendo “n” o número de níveis para todas as variáveis e k o número de variáveis. Esta versão de planejamento exige que os experimentos devam ser realizados em todas as combinações possíveis dentro do intervalo selecionado (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

A segunda etapa diz respeito aos dados de modelagem obtidos pela aplicação da metodologia de superfície de resposta. Nesta metodologia, verifica-se o ajuste das funções polinomiais aos dados para demonstrar o comportamento das respostas geradas nos experimentos (VELJKOVIĆ et al., 2018). Para o ajuste de funções, utilizam-se desenhos experimentais, tais como: planejamento fatorial completo de três níveis, Box-Behnken, composto central e matriz de Doehlert (NOVAES et al., 2016). O planejamento Box-Behnken tem apenas três níveis (-1, 0 e +1). Tem como vantagens ser muito econômico e eficiente, o número de experimentos é dado pela expressão $k^2 + k + n_0$ (FERREIRA et al., 2007).

Em um processo de otimização pode ocorrer uma situação na qual se tem mais de uma condição ou resposta a ser maximizada ou minimizada. A otimização pode ser determinada para cada resposta e então analisadas ao mesmo tempo por simples inspeção visual, contudo, pode ocorrer divergência entre as respostas tornando-se mais difícil encontrar uma região de intersecção satisfatória. Outra maneira de otimização de várias respostas é utilizando a função de desejabilidade (NOVAES et. al., 2017).

A função de desejabilidade é utilizada para otimizar várias respostas ao mesmo tempo. Caso contrário, as respostas teriam que ser otimizadas separadamente (LI et al., 2007). Essa otimização, primeiramente envolve a construção de um modelo adequado para cada resposta e a tentativa de

encontrar um conjunto de condições experimentais ótimas que otimize, de alguma maneira, todas as respostas ou as mantenham dentro dos limites desejados (WANG e WAN, 2009), ou seja, a função de desejabilidade de Derringer permite determinar as condições ótimas para várias respostas simultaneamente.

A função de desejabilidade é aplicada da seguinte maneira, primeiro uma função de desejabilidade individual $d_i(\hat{y}_i)$ para cada resposta $\hat{y}_i(k)$ deve ser criada usando os modelos ajustados e estabelecendo os critérios de otimização. A desejabilidade varia entre 0 e 1, onde $d_i(\hat{y}_i) = 0$ representa uma resposta indesejável, e $d_i(\hat{y}_i) = 1$ é um valor ideal, ou seja, e resposta desejável. Valores intermediários de $d_i(\hat{y}_i)$ indicam respostas mais ou menos desejáveis (CANDIOTI et al., 2014). Com os valores de desejabilidades individuais obtidos é possível calcular a desejabilidade global (D), que é obtida pela média geométrica das desejabilidades individuais (NOVAES et. al., 2017).

Dessa maneira, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e otimização de procedimento de extração assistido por ultrassom de compostos fenólicos em *Capsicum frutescens* e estudar a ação de reguladores vegetais na composição fenólica desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. C. et al. Sequential high-pressure extraction to obtain capsinoids and phenolic compounds from biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 112-121, 2019.
- AHMAD-QASEM, M. H. et al. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.17, p. 120-129, 2013.
- ALONSO, R. et al. Malbec grape (*Vitis vinifera* L.) responses to the environment: Berry phenolics as influenced by solar UV-B, water deficit and sprayed abscisic acid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 84-90, 2016.
- ALRASHDI, A. M. et al. Quality, antioxidant compounds, antioxidant capacity and enzymes activity of 'El-Bayadi'table grapes at harvest as affected by preharvest salicylic acid and gibberellic acid spray. **Scientia Horticulturae**, v. 220, p. 243-249, 2017.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ASHRAF, M. A. et al. Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. In: **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. 2018. p. 153-167.
- BAE, H. et al. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 751-758, 2012.
- BAENAS, N. et al. Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: technological benefits and biological advantages. **Food Chemistry**, v. 274, p. 872–885, 2018.
- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of food engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.
- BEREZINA, E. V.; BRILKINA, A. A.; VESELOV, A. P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 139-146, 2017.
- BERKE, T. G.; SHIEH, S. C. *Capsicum* cultivars. In: **Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)**, v. 1, 2012. p. 116-130.

BOSE, S. K. et al. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant physiology and biochemistry**, v. 66, p. 150-158, 2013.

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014.

CARTEA, M. E. et al. Phenolic compounds in Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251–280, 2011.

CARVALHO, S. I. C. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 27p.

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CONG-CONG, X. U. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.

CVETKOVIĆ, D. et al. Aronia leaves at the end of harvest season—Promising source of phenolic compounds, macro-and microelements. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 17-25, 2018.

DALL, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de compostos fenólicos em vinho: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2014.

DENG, L.Z. et al. Red pepper (*Capsicum annuum* L.) drying: effects of different drying methods on drying kinetics, physicochemical properties, antioxidant capacity, and microstructure. **Drying Technology**, v. 36, n. 8, p. 893-907, 2017.

DHANANI, T. et al. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1193-S1199, 2013.

EROGUL, D.; SEN, F. Effects of gibberellic acid treatments on fruit thinning and fruit quality in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 137-142, 2015.

FERRARA, G. et al. Application of abscisic acid (S-ABA) and sucrose to improve colour, anthocyanin content and antioxidant activity of cv. C rimson S seedless grape berries. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, n. 1, p. 18-29, 2015.

FERREIRA, S. L. C. et al. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied spectroscopy reviews**, v. 42, n. 5, p. 475-491, 2007.

FREIRE, J. M. et al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2291-2295, 2013.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n.12, p. 8813-8826, 2010.

GAYOSO, C. et al. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. **Scientia Horticulturae**, v. 102, n. 1, p. 1-13, 2004.

GIANNAKOULA, A. E. et al. The effects of plant growth regulators on growth, yield, and phenolic profile of lentil plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 1, p. 46-53, 2012.

GIUFFRIDA, D. et al. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 794-802, 2013.

GURNANI, N. et al. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 462-470, 2016.

IBIZA, V.P. J. et al. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region, Genet. **Genetic resources and crop evolution**, v. 59, p. 1077-1088, 2012.

JAMALIAN, S.; GHOLAMI, M.; ESNA – ASHARI, M. Abscisic acid – mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield is strawberry under different salt stress regimes. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.25, n. 4, p. 291-299, 2013.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Bioactive compounds in peppers and their antioxidant potential. In: **Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds**, 2012. p. 43-56

JIANG, X. et al. Comparison of phenolic compound accumulation profiles in eight evergreen woody core eudicots indicating the diverse ecological adaptability of *Camellia sinensis*. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 200-206, 2017.

KARTIKA, H. et al. Major phenolic acids and total antioxidant activity in Mamaki leaves, *Pipturus albidus*. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 696–701, 2007.

KHANAM, U. K. S. et al. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 979-987, 2012.

KOVÁČIK, J. et al. Effect of metabolic regulators on aluminium uptake and toxicity in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 140-148, 2012.

KUMAR, N. et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186-199, 2014.

LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 731-737, 2008.

LI, J. et al. Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: an application in glutamine production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 563-571, 2007.

LIU, L. et al. Zirconium (IV)-based metal organic framework (UIO-67) as efficient sorbent in dispersive solid phase extraction of plant growth regulator from fruits coupled with HPLC fluorescence detection. **Talanta**, v. 154, p. 23-30, 2016.

Li, X. J. et al. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 4, p. 929-940, 2010.

LOPES, C. A. et al. Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp): Botânica, importância econômica, colheita, consumo e comercialização. 2007. **Embrapa Hortaliças, Sistema de Produção**, v. 4. Disponível em:<<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>>. Acesso em 26 de outubro de 2018.

MARINCAŞ, O. et al. Optimized and validated method for simultaneous extraction, identification and quantification of flavonoids and capsaicin, along with isotopic composition, in hot peppers from different regions. **Food chemistry**, v. 267, p. 255-262, 2018.

MELO, E. D. A. et al. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 67-72, 2008.

MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 4, 2014.

MOUSSI, K. et al. HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 858-866, 2015.

MURCIA, G. et al. ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. **Phytochemistry**, v. 135, p.34-52, 2017.

NAPOLEÃO, T. A. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. **Plant Science**, v. 263, p. 46-54, 2017.

NOVAES, C. G. et al. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331-346, 2016.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-parte i: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 1184-1215, 2017.

OCHOA-VELASCO, C. E. et al. Biotic and Abiotic Factors to Increase Bioactive Compounds in Fruits and Vegetables. In: **Food Bioconversion**, 2017. p. 317-349.

PADILHA, H. K. M. et al. Genetic variability for synthesis of bioactive compounds in peppers (*Capsicum annuum*) from Brazil. **Food Science and Technology**, v. 35, p. 516-523, 2015.

PANIGRAHI, J. et al. Gibberellic acid coating: A novel approach to expand the shelf-life in green chilli (*Capsicum annuum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 581-588, 2017.

PÉREZ-TORTOSA, V. et al. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. **Food chemistry**, v. 130, n. 2, p. 362-369, 2012.

PICO, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, 2013.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 156, p. 313-322, 2018.

PINTO, C. M. F. et al. Plantas condimentares: do uso doméstico à comercialização. **Informe Agropecuário**, v. 31, p. 62-71, 2010.

RADWAN, D. E. M. Salicylic acid induced alleviation of oxidative stress caused by clethodim in maize (*Zea mays* L.) leaves. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 102, n. 2, p. 182-188, 2012.

RIVAS-SAN VICENTE, M.; PLASENCIA, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 10, p. 3321-3338, 2011.

RODRIGUES, S. et al. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 400-407, 2015.

- RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe agropecuário**, v. 27, n. 235, p. 7-15, 2006.
- SALEH, A. M.; EL-SOUD, W. A. Evidence for “gibberellin-like” activity of coumarin. **South African Journal of Botany**, v. 100, p. 51-57, 2015.
- SANTOS, A. C. A. et al. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar**, v. 7, n. 3, p. 149-156, 2014.
- SARDOEI, A. S. et al. Effects of gibberellic acid (GA₃) on phenolic compounds and antiradical activity of marigold (*Calendula officinalis*). **International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 3, p. 80-84, 2014.
- SAUCEDO-POMPA, S. et al. Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. **Food Research International**, v. 111, p. 438-450, 2018.
- SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, p. 50-55, 2008.
- SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.
- SPILLER, F. et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan-and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 473-478, 2008.
- SREENIVASULU, N. et al. De-regulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant seg8. **The Plant Journal**, v. 64, n. 4, p. 589-603, 2010.
- SRICHAROEN, P. et al. Phytochemicals in *Capsicum* oleoresin from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 38, p. 629-639, 2017.
- SYTAR, O. et al. Shift in accumulation of flavonoids and phenolic acids in lettuce attributable to changes in ultraviolet radiation and temperature. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 193-204, 2018.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669–675, 2006.

TIAN, S. L. et al. Effects of drought stress on capsanthin during fruit development and ripening in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Agricultural Water Management**, v. 137, p. 46-51, 2014.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2015.

VELJKOVIĆ, V. B. et al. Modeling of biodiesel production: Performance comparison of Box–Behnken, face central composite or full factorial design. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, p. S1004-9541, 2018.

VIEIRA, E. L. et al. **Manual de fisiologia vegetal**. São Luis: Edufma, 2010. 230 p.

VILLALOBOS-GONZÁLEZ, L. et al. Long-term effects of abscisic acid (ABA) on the grape berry phenylpropanoid pathway: gene expression and metabolite content. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 213-223, 2016.

XIA, T.; SHI, S.; WAN, X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 4, p. 557-560, 2006.

WANG, J.; WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 3, p. 1253-1259, 2009.

WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, n. 3, p. 162-176, 2016.

WEI, Z. F. et al. Variation in contents of main active components and antioxidant activity in leaves of different pigeon pea cultivars during growth. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 42, p. 10002-10009, 2013.

WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, 2018.

YAHYA, N. A.; ATTAN, N.; WAHAB, R. A. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 112, p. 69-85, 2018.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic botany**, v. 59, n. 1, 2005.

ZEB, A. A reversed phase HPLC-DAD method for the determination of phenolic compounds in plant leaves. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7753-7757, 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese medicine**, v. 13n. 1, p. 20, 2018.

ZHANG, X. L. et al. Cold plasma pretreatment enhances drying kinetics and quality attributes of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 51-57, 2018.

ARTIGO 1

OTIMIZAÇÃO DE PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM *Capsicum frutescens*¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Food Analytical Methods*, em versão na língua inglesa.

Otimização de procedimento para extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em *Capsicum frutescens*

RESUMO: Os compostos fenólicos presentes em alimentos vêm sendo largamente estudados, devido à comprovação de sua ação antioxidante. A otimização de fatores que influenciam no procedimento de extração de compostos fenólicos é muito importante, pois eles englobam uma grande quantidade de substâncias e são, na maior parte dos casos, muito polares, reativos, e vulneráveis à ação de enzimas. Objetivou-se otimizar um procedimento de extração assistido por ultrassom e quantificar compostos fenólicos em amostras de *Capsicum frutescens*. As amostras vegetais (folhas e frutos) foram compradas no comércio de Cruz das Almas, logo em seguida o material foi seco a 45°C e triturado. Para otimizar o processo, primeiro foi otimizada a composição da solução extratora utilizando água, metanol e etanol. Depois foram as variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e temperatura utilizando o planejamento Box-Benhker junto com a função de desejabilidade, os resultados obtidos foram analisados no programa Statística 7.0. A melhor composição de mistura foi 93% de metanol e 7% de água e as melhores condições experimentais foram 16 mL de solução extratora, 45 minutos de sonicação e 40 °C de temperatura para folha e 16 mL, 19,5 minutos e 53 °C para fruto, além disso, foram identificados doze compostos nas amostras de frutos de pimenta: ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol. O planejamento Box-Benhker foi uma ferramenta eficiente para otimização do método analítico utilizando a ultrassom para extração de compostos fenólicos em amostras de *C. frutescens*.

Palavras-chave: Bioativos, Box-benhker, planejamento da mistura.

Optimization of procedure for extraction assisted by ultrasound of phenolic compounds in *Capsicum frutescens*

Abstract: The phenolic compounds present in foods have been widely studied, due to the evidence of their antioxidant action. The optimization of factors that influence the procedure for extraction of phenolic compounds is very important, because they encompass a large quantity of substances and are, in most cases, very polar, reactive, and vulnerable to the action of enzymes. This study aimed to optimize a procedure of extraction assisted by ultrasound and quantify phenolic compounds in samples of *Capsicum frutescens*. The samples of plants (leaves and fruits) were purchased in trade of Cruz das Almas, soon after the material was dried at 45°C and crushed. To optimize the process, first was optimized composition of the stripper solution using water, methanol and ethanol. Then were the variables volume of solvent, sonication time and temperature using the planning Box-Benhker along with the function of desirability, the results obtained were analyzed in the program Statistica 7.0. The best composition of mixture was 93% of methanol and water 7% and the best experimental conditions were 16 mL of extraction solution, 45 minutes of sonication and 40°C temperature for leaf and 16 mL, 19.5 minutes and 53°C for fruit, furthermore were identified 12 compounds in samples of fruits of pepper: *trans*-cinnamic acid, gallic acid, quercetin, siríngico acid, ellagic acid, catechin, ferulic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, vanílico acid, cafeico acid and kaempferol. The Box-Benhker planning was an efficient tool for optimization of analytical method using ultrasound for extraction of phenolic compounds in samples of *C. frutescens*.

Keywords: Bioactive, Box-benhker, mixture design.

1. INTRODUÇÃO

As pimenteiras são de grande importância na alimentação humana, apresentam compostos fenólicos em sua constituição e desde a época colonial até os dias atuais seus frutos são muito usados na culinária e na medicina popular (MORAES et al., 2013). Atualmente a quantidade de produtos alimentícios constituídos de pimenta é grande, a exemplo temos molhos, patês, salgadinhos, macarrão, maioneses, catchups, mostardas, queijos entre outros (PINTO, PINTO e DONZELES, 2013).

Os compostos fenólicos presentes em alimentos *in natura* vêm sendo largamente estudados devido à comprovação de sua ação antioxidante. Os compostos fenólicos estão associados ao aumento de efeitos promotores da saúde humana por meio da prevenção de várias doenças (GIADA e MANCINI FILHO, 2006).

Antioxidantes são compostos que impedem a oxidação de outros compostos (LLACUNA e MACH, 2012; BITTENCOURT et al., 2015; EMBUSCADO, 2015), e sua presença em quantidades significativas em um extrato pode inativar os radicais livres, que são responsáveis pelo envelhecimento precoce das células animais. Os ácidos hidroxicinâmico, hidroxibenzóico, os flavonoides e taninos são classes de compostos fenólicos que conferem atividade antioxidante às plantas (CASAGRANDE et al., 2018).

Os compostos bioativos, como compostos fenólicos estão presentes em níveis mais baixos do que os lipídios, proteínas, carboidratos e minerais. Outro problema é que os compostos bioativos, como flavonoides e antocianinas entre outros, estão presentes em estruturas insolúveis, o que torna sua extração um desafio (CORRALES et al., 2008), elevando a importância da escolha correta do método de extração.

Normalmente, um processo de extração de compostos consiste na mistura do material com o solvente, e no movimento de material solúvel presente na amostra para o solvente e sua consequente difusão e extração (HUANG et al., 2013).

Os métodos tradicionais de extração (soxhlet, extração por decocção, extração por solvente, extração por destilação a vapor e a extração por alta

pressão hidrostática), têm certas desvantagens, como longo tempo de análise, procedimentos trabalhosos, baixos rendimentos de extração e gasto de grandes quantidades de solventes (SAHA et al., 2015). Vários outros métodos mais sofisticados são usados para extrair bioativos em amostras vegetais, incluindo a extração assistida por ultrassom, que tem como vantagens, redução do tempo e do volume do solvente gasto na extração, bem como aumentar as recuperações do analito (IRAKLI, CHATZOPOULOU e EKATERINIADOU, 2018).

Na extração mediada por ultrassom, o colapso das bolhas de cavitação e a temperatura altamente localizada levam à quebra das paredes celulares e à liberação dos compostos das células para o solvente de extração (EBRINGEROVÁ e HROMÁDKOVÁ, 2010).

A escolha do solvente mais apropriado para extrair os bioativos das amostras é uma etapa importante (WEN et al., 2018), pois a cavitação é afetada pelas propriedades físicas do solvente (ESCLAPEZ et al., 2011). Outro fator importante é a temperatura, visto que em temperaturas elevadas há o aumento da difusão do solvente e interferência na cavitação. Da mesma forma, o tempo deve ser otimizado no intervalo adequado. Longo tempo de extração aumenta o rendimento da mesma, mas pode induzir alterações indesejáveis nos compostos extraídos (WEN et al., 2018), como degradação de compostos bioativos (PIMENTEL-MORAL et al., 2018).

A otimização de variáveis operacionais, tais como o solvente para a extração, tempo, temperatura e relação sólido/solvente, aumentam a concentração de compostos bioativos extraídos e mantêm baixos os custos do processo (DIAS et al., 2017). Portanto, é imprescindível o desenvolvimento e otimização de métodos de extração para fornecer a composição real e ótimos níveis de compostos fenólicos em pimentas (BAE et al., 2012).

A otimização dos fatores operacionais a um nível ideal é uma etapa muito importante no aumento da eficiência de extração. As estratégias de otimização multivariada como metodologias analíticas são muito utilizadas, pois essas estratégias diminuem o número de experimentos necessários para atingir as condições ideais. A metodologia de superfície de resposta é uma abordagem de otimização multivariada usada em vários procedimentos analíticos (BEZERRA et al., 2008), assim como o planejamento Box-Behnken, o mesmo tem maior

eficiência, quando se tem três variáveis que precisam ser otimizadas (GOMES et al., 2017), outra ferramenta utilizada é a função de desejabilidade, que possibilita a otimização de varias respostas analíticas simultaneamente (LI et al., 2007).

O objetivo foi otimizar um procedimento de extração assistido por ultrassom e quantificar compostos fenólicos em amostras de *Capsicum frutescens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As pimenteiras (*Capsicum frutescens*) foram compradas no comércio local da Cidade de Cruz das Almas - BA, foi coletado das plantas as folhas e frutos, em seguida foram cortados e colocados para secar em estufa a 45° C até atingirem massa constante, posteriormente foram trituradas em um moinho de facas, armazenadas em recipientes de vidro e mantidas no congelador até o uso.

Instrumentação e reagentes

O etanol e metanol foram adquiridos pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., México). O reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões de ácido gálico, quercetina, ácido *trans*-cinâmico, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol são da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os cromatogramas foram obtidos a partir de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão), equipado com quatro bombas de alta pressão (LC-20AD, Shimadzu, Japão), detectores de arranjo de diodos (DAD, SPD20A, Shimadzu, Japão), interfaceados em série (CBM-20A, Shimadzu, Japão) com uma coluna RP 18 "LiChrospher" (5 µm, 4,6 × 250 mm, Agilent, Brasil) e controlada pelo software LC-System. Água ultrapura foi obtida (18,2 MΩ cm) de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Os tubos de ensaio foram sonicados em um banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H®, F.: 50/ 60 Hz, P.: 90 W, Alemanha) e em seguida centrifugados em uma centrífuga durante 5 min a 1125 G.

Otimização da composição da mistura extratora

Aplicou-se um procedimento de otimização multivariada, usando o Simplex centroide. Os três solventes escolhidos para comparar a extração de fenólicos foram água deionizada, etanol e metanol. As amostras de folha e fruto de *C. frutescens* L. (0,15 g) foram combinadas com 6 mL de cada solução em tubos de ensaio. Posteriormente, foram sonicados em ultrassom durante 5 min. As respostas fenólicos e flavonoides totais foram otimizadas simultaneamente utilizando a função de desejabilidade.

Otimização das variáveis experimentais da extração assistida por ultrassom

Após otimização da mistura foi utilizado um planejamento fatorial de dois níveis (2^3) para a avaliação preliminar de três fatores, envolvendo as seguintes variáveis: volume do solvente (Vol), tempo de sonicação (T) e temperatura do solvente (TS), sendo os valores determinados com base na literatura.

Após verificação da significância das variáveis e suas interações, foram otimizadas as variáveis que afetaram de forma significativa na resposta analítica utilizando o planejamento Box-Benhker com metodologia de superfície de resposta. As amostras de folha e fruto de *C. frutescens* L. utilizadas foram 0,08 g. Para otimizar as respostas (fenólicos e flavonoides totais) simultaneamente foi utilizada a função de desejabilidade em todos os experimentos realizados.

Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos de folha e fruto foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão e seguiu a metodologia de Slinkard e Singleton (1977) com modificações. 400 μ L do extrato da amostra e 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio foram adicionados com 300 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. Após 60 min de reação à temperatura ambiente e em ambiente escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro TECNAL® a 750 nm. Os testes foram realizados

em triplicata. O teor total de compostos fenólicos foi calculado a partir da curva de calibração do ácido gálico e expresso em equivalente de ácido gálico.

Determinação dos flavonoides totais

A determinação dos flavonoides seguiu a metodologia proposta por Marques et al. (2012) com modificações, 500 μL do extrato da folha e 2,0 mL para extrato do fruto foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, com 2,0 mL de uma solução etanólica de AlCl_3 (5%, m v^{-1}). O volume foi completado para 10 mL com uma solução hidroalcoólica (40%, v v^{-1}). Após os procedimentos esperou-se 30 min antes de realizar as leituras em um espectrofotômetro TECNAL® a 408 nm. Os testes foram realizados em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi determinado a partir da curva de calibração com padrão de quercetina e o resultado expresso em equivalente de quercetina.

Análise cromatográfica das amostras de *C. frutescens*

Ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol foram identificados por comparação com espectros padrão em cada tempo de retenção (SANTOS et al., 2017). Os extratos foram filtrados através de um filtro de 0,45 mm depois injetado no CLAE (LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão). A fase estacionária foi uma coluna RP 18 (5 μm , 4,6 \times 250 mm) a uma temperatura de 40°C. A fase móvel foi constituída por solvente A (metanol) enquanto o solvente B uma mistura de água ultrapura acidificada com ácido acético até concentração final de 1% (v v^{-1}). O gradiente utilizado foi 0-10 min, 100% A; 10-20 min, 70% A; 20-30 min, 10% A; 30-37 min, 70% A e 37-40 min, 100% A, a um fluxo de 1 mL min^{-1} . Os compostos foram testados em diferentes comprimentos de onda (nm): 260 ácido vanílico e ácido elágico; 272 ácido siríngico; 280 ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinâmico e catequina; 310 ácido *p*-cumárico; 330 ácido clorogênico e ácido cafeico; e 360 quercetina e kaempferol.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0 para Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Planejamento da mistura

Foi utilizado um planejamento de mistura do tipo simplex centroide com os componentes: água, etanol e metanol, em triplicata, para extrair o máximo de compostos fenólicos nas amostras de *C. frutescens*. As respostas (**Tabela 1**) estudadas foram fenólicos e flavonoides totais, para otimizar simultaneamente as duas respostas foi utilizada a função de desejabilidade. A otimização da mistura extratora é muito importante, pois a eficiência da extração assim como o tipo de compostos fenólicos extraídos é dependente das propriedades químicas do solvente extrator. A otimização da mistura de solventes que vai compor a solução extratora deve possibilitar a extração do maior número possível de compostos com diferentes polaridades (GARCIA-SALAS et al., 2010).

Tabela 1 – Planejamento Experimental da mistura (simplex centroide).

Experimentos	Água (%)	Etanol (%)	Metanol (%)	Fenólicos totais ¹		Flavonoides totais ²	
				Folha	Fruto	Folha	Fruto
1	100	0	0	16,31	9,31	7,60	4,25
2	0	100	0	22,21	18,61	9,54	5,27
3	0	0	100	32,06	19,06	16,53	5,44
4	50	50	0	20,96	16,96	19,48	4,67
5	50	0	50	21,51	12,91	21,04	4,89
6	0	50	50	27,21	19,61	12,43	5,41
7	33	33	33	18,56	15,36	20,27	2,06
8	66	17	17	20,01	13,21	18,96	5,31
9	17	66	17	16,61	16,41	19,81	3,60
10	17	17	66	21,66	18,71	20,31	3,58

¹ Concentração expressa em mg de Ac. Gálico g⁻¹; ² Concentração expressa em mg de Quercetina g⁻¹.

A partir da superfície de resposta (**Figura 1**) e do gráfico de contorno (**Figura 2**) é possível encontrar a melhor proporção para obter uma maior extração dos fenólicos e flavonoides totais presentes na amostra de folha de

C. frutescens. Os resultados encontrados a partir da inspeção visual demonstram que as melhores condições de extração dos fenólicos e flavonoides totais das folhas de *C. frutescens* foram com 93% de metanol e 7% de água. A água é um solvente de grande eficiência (TAIZ e ZEIGER, 2017), mas possui alta viscosidade, por isso recomenda-se misturar com outros solventes como metanol. ŠAMEC et al. (2016) encontraram uma maior concentração de ácidos fenólicos individuais nos extratos com metanol em comparação com extratos aquosos de *Gynostemma pentaphyllum*, indicando que 80% de metanol é um solvente de extração mais adequado.

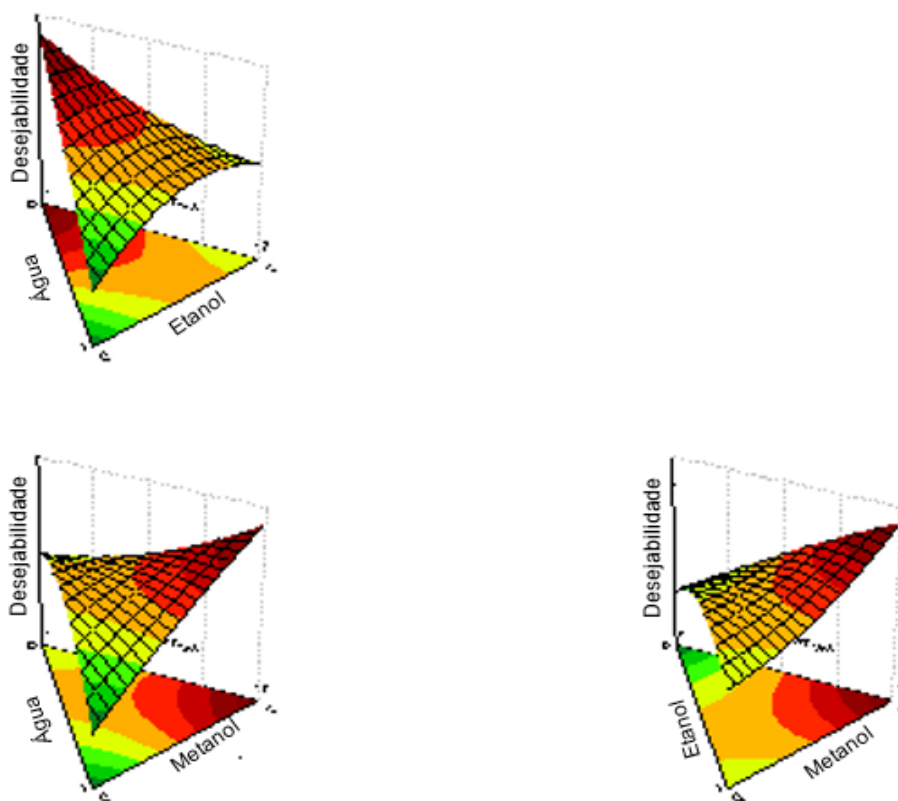


Figura 1 – Gráfico de Superfície de resposta em três dimensões do planejamento de mistura.

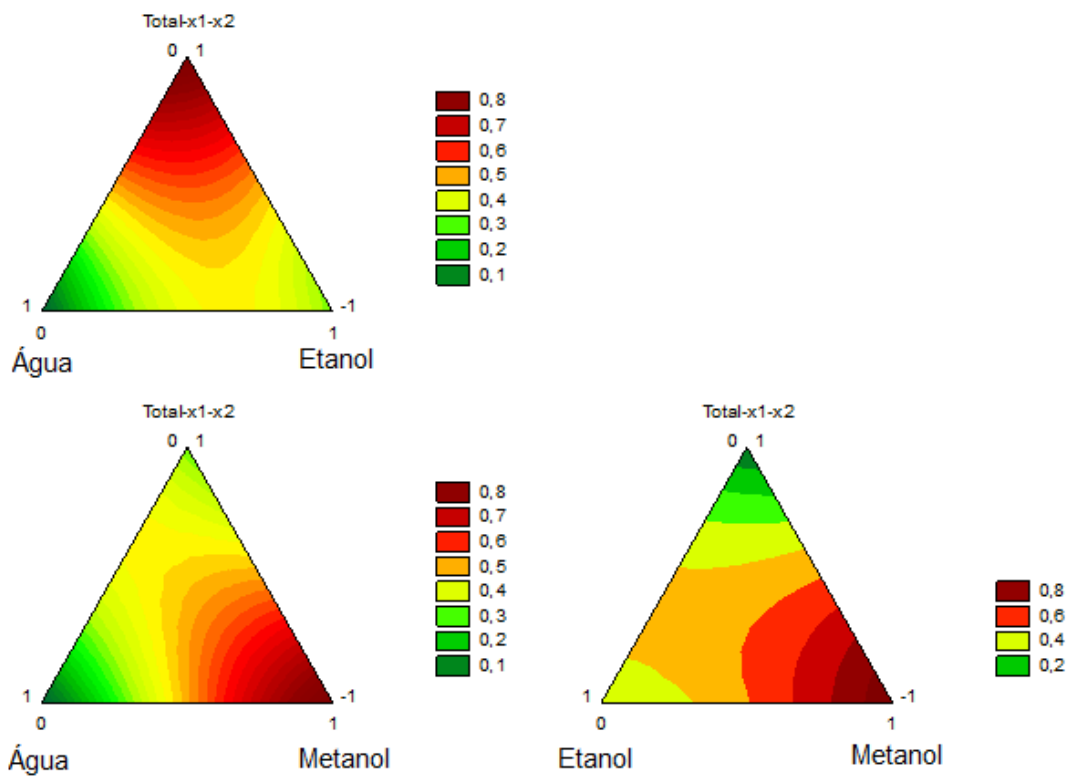


Figura 2 – Gráfico de contorno do planejamento de mistura.

Planejamento fatorial completo de dois níveis

Um planejamento fatorial completo foi utilizado para seleção das variáveis que afetam as respostas estudadas no procedimento de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de folha e fruto de *C. frutescens*. Os fatores estudados (tempo de sonicação, temperatura e volume do solvente) foram selecionados a partir da literatura. A escolha dos fatores é importante para a eficiência do processo de otimização. Para a avaliação dos seus efeitos no processo, é muito usado um planejamento fatorial completo de dois níveis, ele permite identificar os fatores estatisticamente significativos (FERREIRA et al., 2018). A Tabela 2 apresenta os resultados expressos em equivalente a ácido gálico e quercetina por g da amostra do planejamento fatorial completo.

Tabela 2 – Planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) para as variáveis: tempo, temperatura e volume do solvente na extração de compostos fenólicos em *C. frutescens*.

Experimentos	Vol (mL)	T (min)	TS (°C)	Fenólicos totais ¹		Flavonoides totais ²	
				Folha	Fruto	Folha	Fruto
1	5 (-) ³	2 (-)	30 (-)	3,69	7,13	9,37	4,77
2	15 (+)	2 (-)	30 (-)	6,94	6,98	17,97	8,21
3	5 (-)	20 (+)	30 (-)	9,84	7,28	21,01	5,36
4	15 (+)	20 (+)	30 (-)	10,95	10,84	30,41	9,81
5	5 (-)	2 (-)	50 (+)	7,51	7,68	17,46	4,91
6	15 (+)	2 (-)	50 (+)	9,28	8,63	26,26	6,73
7	5 (-)	20 (+)	50 (+)	10,38	8,15	23,10	5,21
8	15 (+)	20 (+)	50 (+)	13,09	10,71	39,17	9,80
9	10 (0)	11 (0)	40 (0)	10,47	9,31	29,84	7,67
10	10 (0)	11 (0)	40 (0)	10,19	9,29	28,08	7,45
11	10 (0)	11 (0)	40 (0)	9,75	9,74	28,15	7,33

¹ Concentração expressa em mg de Ac. Gálico g⁻¹; ² Concentração expressa em mg de Quercetina g⁻¹; ³ Limite inferior (-), limite superior (+) e ponto central (0).

A partir do gráfico de Pareto (**Figura 3**), observa-se que, para amostra de folha, a um nível de 95% de confiança, que as variáveis tempo de sonicação, volume do solvente extrator e temperatura foram as variáveis que afetaram de forma significativa a resposta analítica dentro do intervalo estudado. O efeito dessas variáveis foi positivo, indicando que o aumento dos níveis das mesmas causa aumento na desejabilidade. A temperatura de extração pode desempenhar um papel importante na tensão superficial, viscosidade do meio líquido e pressão de vapor. O efeito da temperatura de extração sobre os compostos fenólicos são associados às espécies de plantas, que possuem diferentes tipos e formas de polifenol (DENG et al., 2017). Por outro lado, a altas temperaturas a potência do solvente aumenta devido a uma diminuição da viscosidade e da tensão superficial, permitindo uma melhor penetração do solvente (PIMENTEL-MORAL et al., 2018).

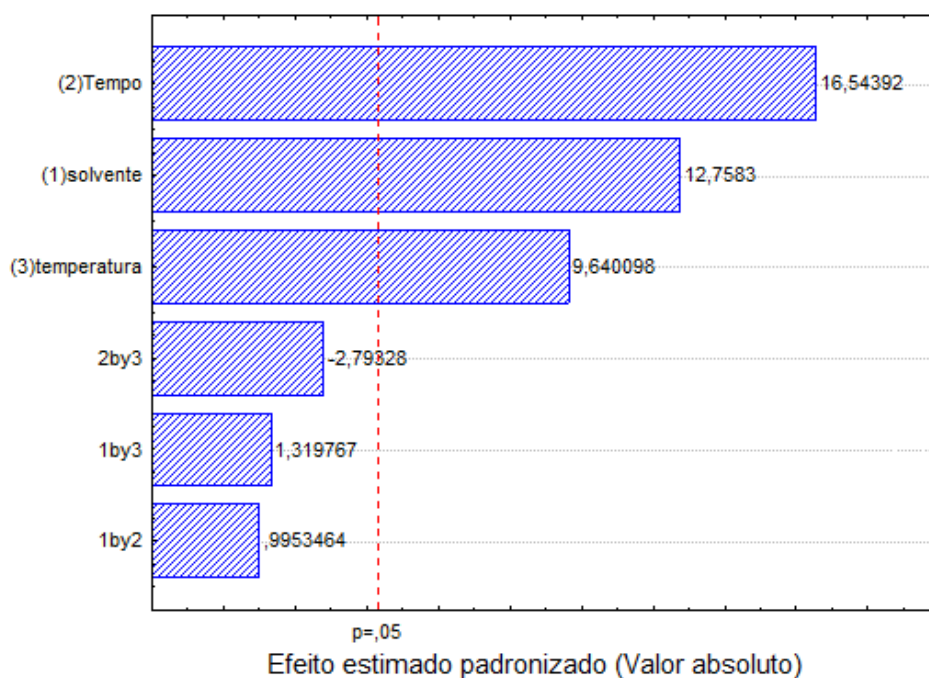


Figura 3 – Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis das variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e temperatura de extração de compostos fenólicos em folhas de *C. frutescens*.

Para a amostra de fruto (**Figura 4**), o solvente e o tempo de sonicação que influenciaram significativamente na resposta analítica, sendo que ambos tiveram efeito positivo, ou seja, o aumento do volume do solvente e do tempo de extração aumenta a resposta de desejabilidade. Tanto o tempo quanto à relação massa solvente são importantes, pois longos tempos de extração podem degradar os compostos fenólicos no banho ultrassônico, já a relação massa solvente influencia substancialmente o rendimento de compostos fenólicos. O volume do solvente é indiretamente proporcional à viscosidade e concentração do solvente (AL-DHABI, PONMURUGAN e JEGANATHAN, 2017).

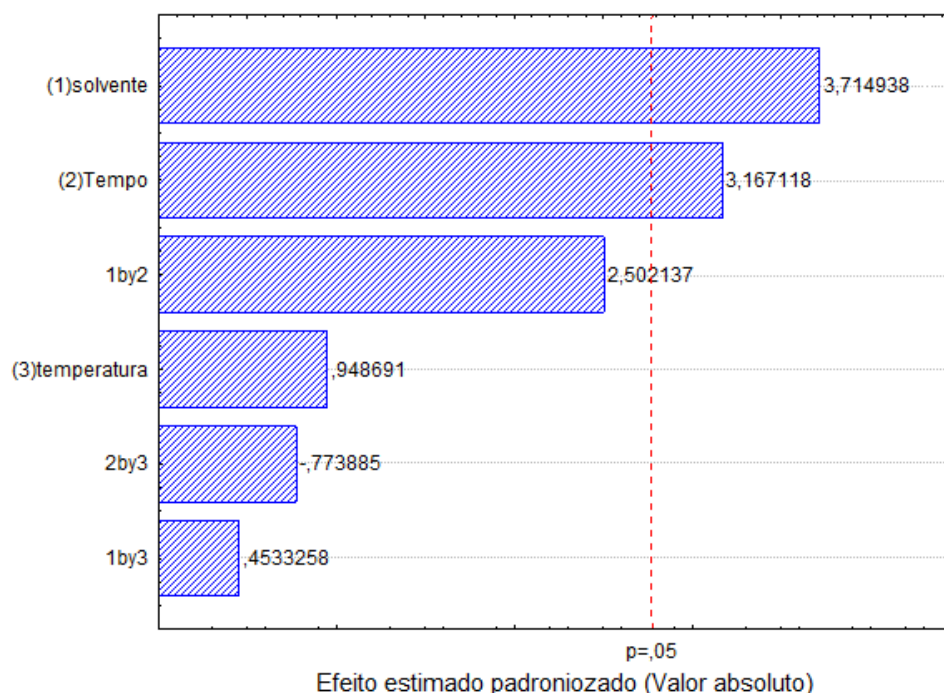


Figura 4 – Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo de dois níveis das variáveis volume do solvente, tempo de sonicação e temperatura de extração de compostos fenólicos em frutos de *C. frutescens*.

Planejamento Box- Benhker

As variáveis que afetam significativamente nas respostas analíticas, foram otimizadas usando o planejamento Box- Benhker e a função de desejabilidade. O planejamento Box- Behnken tem apenas três níveis (-1, 0 e +1). Tem como vantagem ser muito econômico e eficiente, o número de experimentos é dado pela expressão $k^2 + k + n_0$ (FERREIRA et al., 2007).

A metodologia de superfície de resposta (**Figura 5 e 8**) e os perfis de desejabilidade (**Figura 7 e 10**) ilustram o efeito do volume (Vol) e temperatura do solvente (TS) e tempo de sonicação (T) na extração de amostras de folha e fruto de *C. frutescens*.

Tabela 3 – Planejamento Box-Benhker para as três variáveis significativas na extração de compostos fenólicos em *C. frutescens*.

Experimentos	Vol (mL)	T (min)	TS (°C)	Fenólicos		Flavonoides	
				totais ¹		totais ²	
				Folha	Fruto	Folha	Fruto
1	8 (-) ³	15 (-)	50 (0)	24,95	13,04	25,05	4,25
2	16 (+)	15 (-)	50 (0)	21,19	14,18	20,86	4,91
3	8 (-)	45 (+)	50 (0)	27,31	13,14	23,42	4,41
4	16 (+)	45 (+)	50 (0)	32,66	12,48	30,99	5,72
5	8 (-)	30 (0)	40 (-)	23,43	11,91	19,44	3,74
6	16 (+)	30 (0)	40 (-)	25,72	14,18	54,60	2,64
7	8 (-)	30 (0)	60 (+)	30,92	12,97	27,61	1,88
8	16 (+)	30 (0)	60 (+)	34,22	19,70	29,77	0,63
9	12 (0)	15 (-)	40 (-)	25,08	12,65	24,93	2,26
10	12 (0)	45 (+)	40 (-)	27,71	12,81	27,58	1,90
11	12 (0)	15 (-)	60 (+)	28,96	13,61	25,54	4,41
12	12 (0)	45 (+)	60 (+)	31,27	13,87	28,50	4,79
13	12 (0)	30 (0)	50 (0)	24,15	12,60	24,57	4,84
14	12 (0)	30 (0)	50 (0)	25,98	13,08	27,79	4,61
15	12 (0)	30 (0)	50 (0)	22,03	13,18	20,08	4,17

¹ Concentração expressa em mg de Ac. Gálico g⁻¹; ² Concentração expressa em mg de Quercetina g⁻¹; ³ Limite inferior (-), limite superior (+) e ponto central (0).

O resultado encontrado a partir do perfil de desejabilidade demonstra que as melhores condições experimentais foram: 16 mL do volume da solução extratora, 45 minutos o tempo de sonicação e 40°C a temperatura de extração para folha. Gomes et al. (2017) conseguiram otimizar um método de extração de compostos fenólicos de espécies de *Passiflora* utilizando Box-Behnken combinado com a função de desejabilidade. Goldsmith et al. (2018) constataram que a extração assistida por ultrassom aumentou a quantidade de compostos fenólicos extraídos do bagaço de azeitona. Soria e Villamiel (2010) observaram que a sonicação aumenta a transferência de massa de solutos no solvente, aumentando a extração de compostos antioxidantes. O uso de ultrassom para

extrair compostos bioativos de dentro da amostra vegetal pode promover a ruptura celular, aumentando o contato soluto / solvente (PUROHIT e GOGATE, 2015).

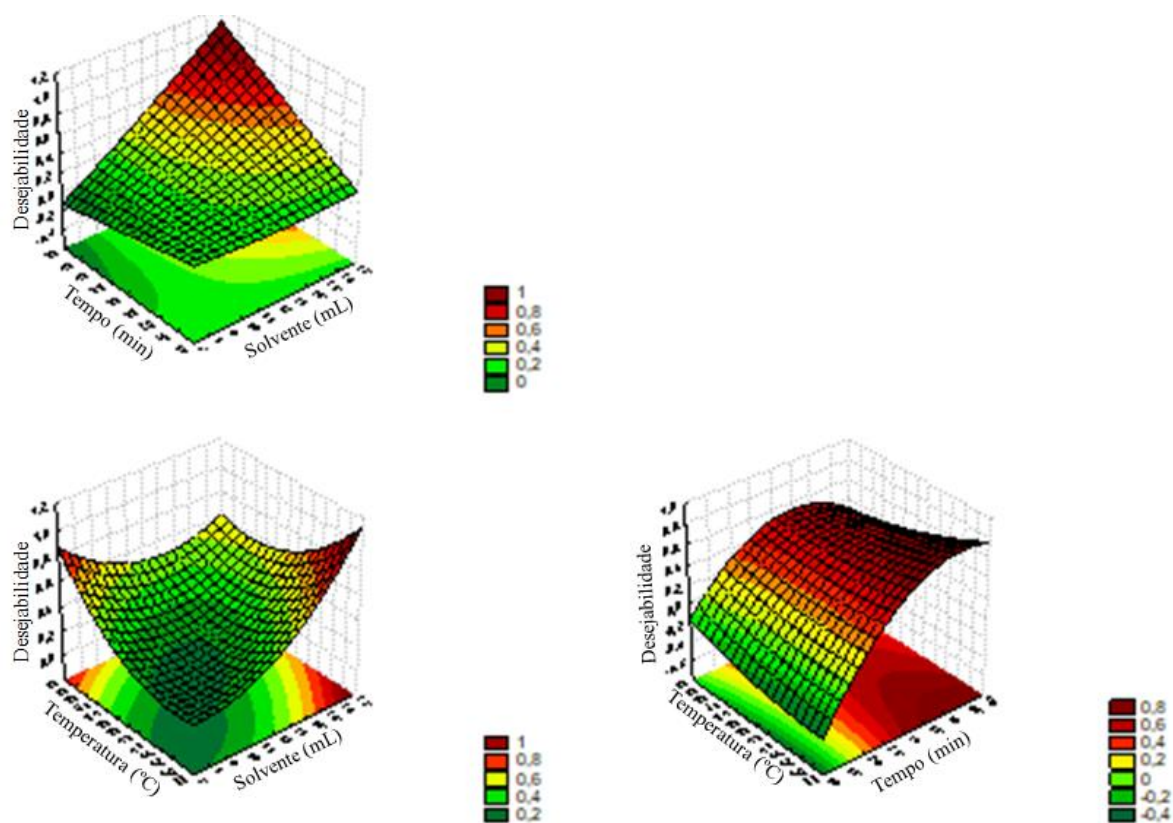


Figura 5 – Gráfico de superfície de resposta na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostras de folhas.

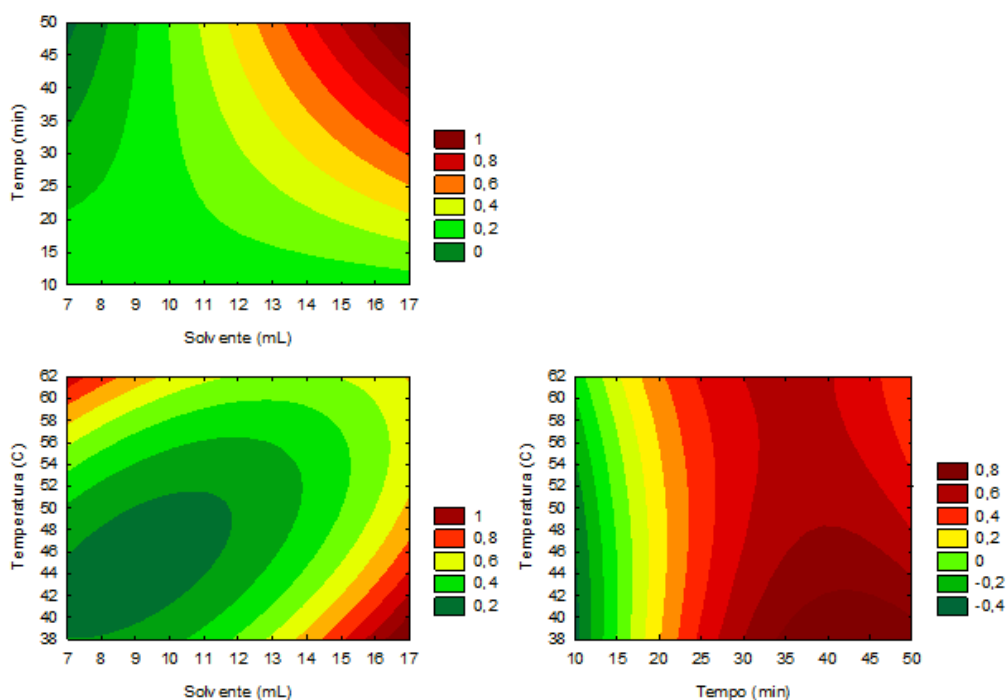


Figura 6 – Gráfico de contorno na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de folhas.

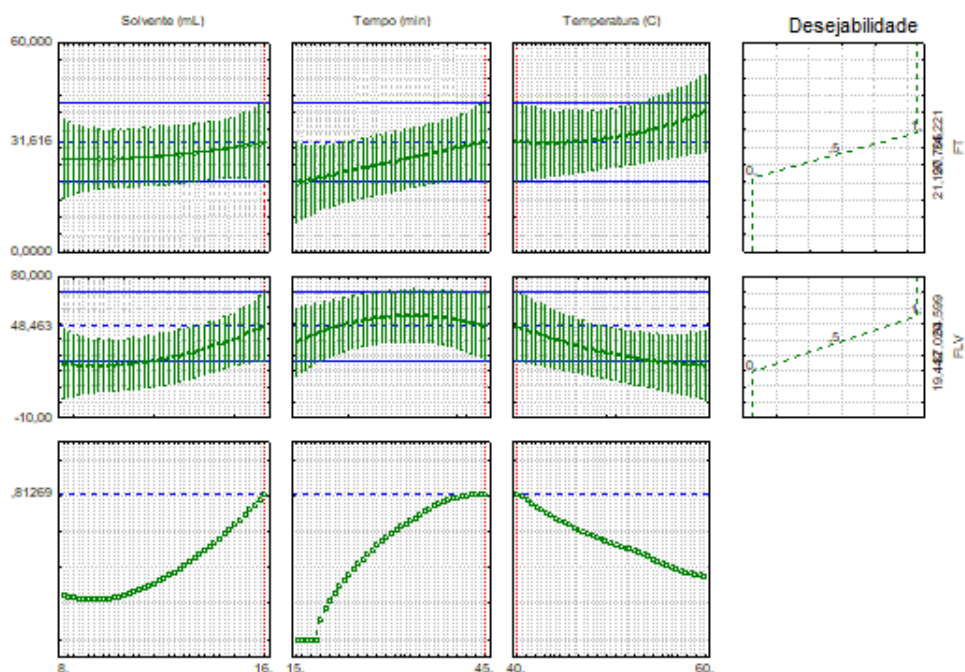


Figura 7 – Perfil desejabilidade na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de folhas.

Para a amostra de frutos as melhores condições encontradas foram 16 mL do volume da solução extratora, 19,5 minutos o tempo de sonicação e 53 °C a temperatura de extração. Sricharoen et al. (2017) utilizaram 10mL de solução extratora (20% água e 80% metanol), temperatura de 50°C e 20 minutos de sonicação no preparo de extratos de *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*.

Pode-se observar que para ambas as amostras os volumes de solvente para a extração foram iguais, mas em relação à temperatura do solvente, para as amostras de frutos, o valor foi maior, ocasionando um menor tempo de extração diferente das amostras de folhas. Maior temperatura e intensidade ultrassônica aumentaram os rendimentos de extração de bioativos em amostras de pimentas dedo de moça (DIAS et al., 2017). De acordo com Purohit e Gogate (2015), a temperatura influencia o rendimento global de bioativos alterando a solubilidade do soluto no solvente de extração e modificando sua viscosidade e densidade, o que pode ter um efeito notável sobre a atividade cavitacional.

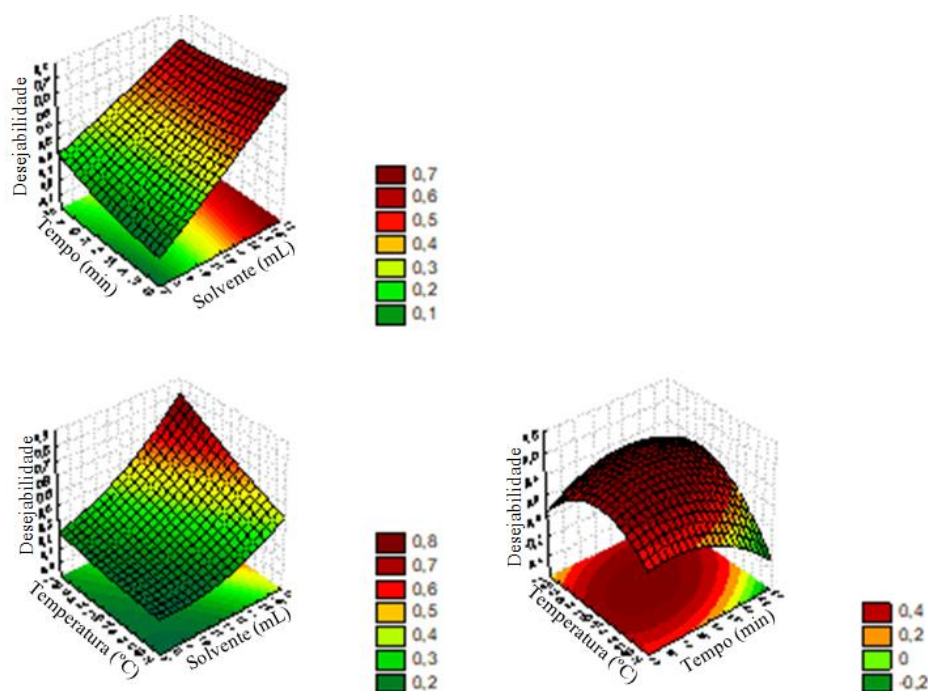


Figura 8 – Gráfico de superfície de resposta na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de frutos.

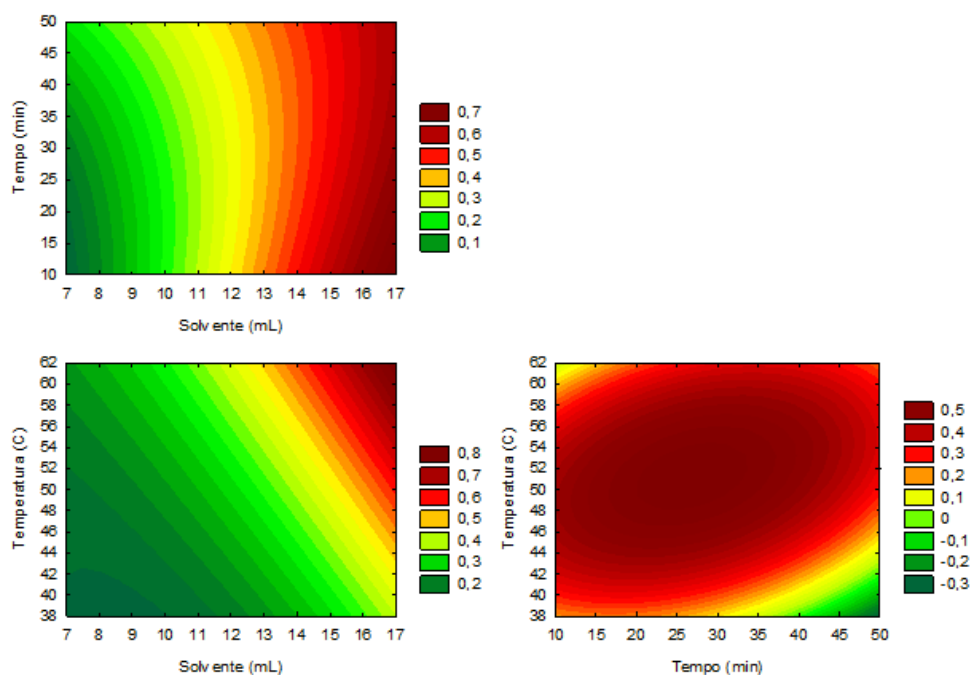


Figura 9 – Gráfico de contorno na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de frutos.

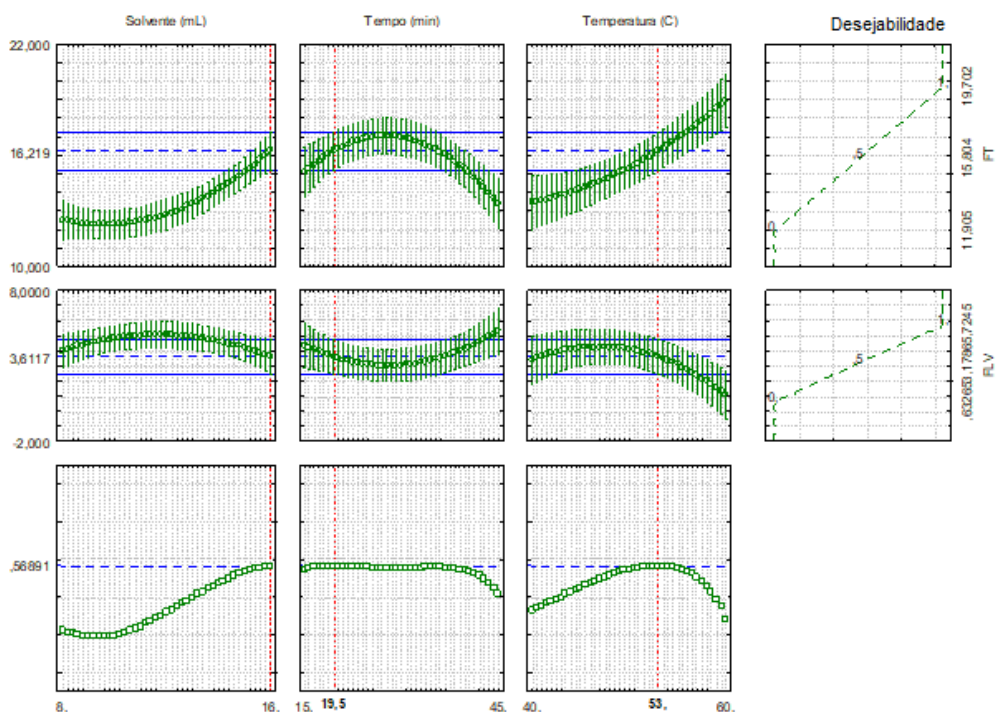


Figura 10 – Perfil desejabilidade na otimização das variáveis significativas para extração dos compostos fenólicos de amostra de frutos.

A extração assistida por ultrassom é uma técnica simples, rápida, menos dispendiosa e eficaz, com alta reprodutibilidade, alta eficiência de extração em um tempo mínimo, menor produção de energia e aplicabilidade em amostras diversificadas para extração de bioativos (AL-DHABI, PONMURUGAN e JEGANATHAN, 2017). Contudo, sua utilização pode ocasionar degradação de alguns compostos. Para avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos, foram sonicadas amostras analíticas, em triplicata, em duas condições: 45 minutos a 40°C e durante 19,5 minutos a 53°C. Os resultados na Figura 11 mostram que os compostos ácido gálico e quercetina são estáveis nas condições estudadas.

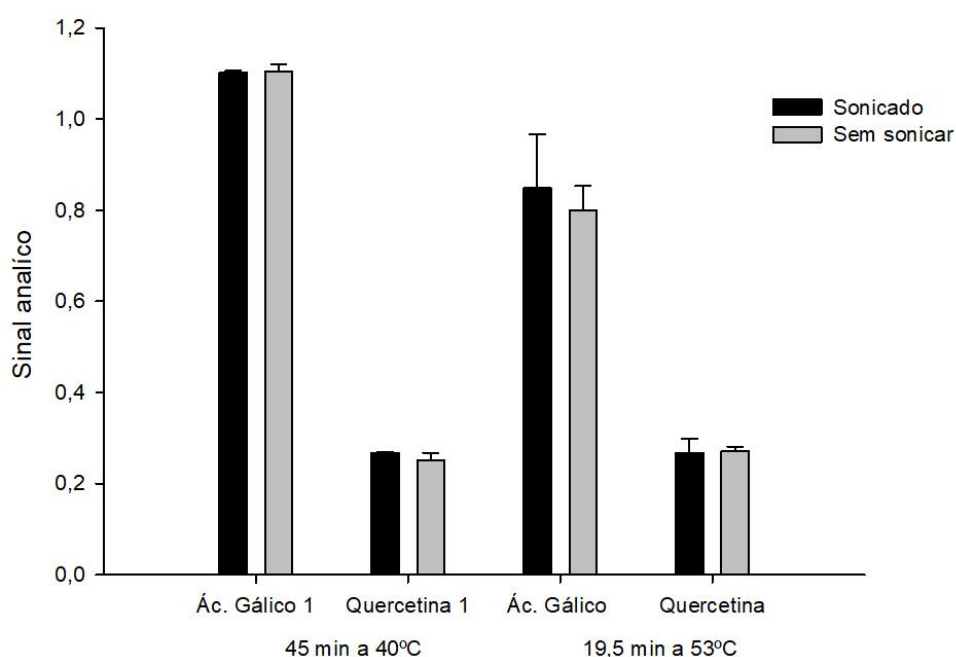


Figura 11 – Teste de estabilidade para o ácido gálico e a quercetina em amostras de *C. frutescens*.

Validação do método

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para que o método analítico seja validado todas as exigências das aplicações analíticas devem ser atendidas, como o limite de detecção e limite de quantificação. A validação serve para garantir que um novo método analítico gere

informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI, COLLINS e BOTTOLI, 2007). O limite de detecção é a menor concentração do analito que é possível diferenciar do sinal de ruído com 95% de confiança (IUPAC, 1978). E o limite de quantificação é a menor concentração em que o analito pode ser quantificado com 95 % de confiança (RIBANI, COLLINS e BOTTOLI, 2007).

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados utilizando a equação $3\sigma(\text{sinal/ruído})$ e $10\sigma(\text{sinal/ruído})$ respectivamente, em que σ é o desvio padrão da razão sinal/ruído (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Analito	LD (mg g⁻¹)	LQ (mg g⁻¹)
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	0,01	0,04
Ácido gálico	0,05	0,15
Quercetina	0,03	0,09
Ácido siríngico	0,01	0,04
Ácido elágico	0,06	0,17
Catequina	0,02	0,05
Ácido ferúlico	0,01	0,03
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,01	0,04
Ácido clorogênico	0,01	0,04
Ácido cafeico	0,01	0,04
Ácido vanílico	0,02	0,06
Kaempferol	0,03	0,08

Adição e recuperação

Foi utilizado o teste de adição e recuperação para avaliar a exatidão do método analítico. A exatidão é a proximidade dos resultados ao valor verdadeiro. Para o teste foi adicionado diferentes concentrações de ácido gálico e quercetina nas amostras de folha e fruto de *C. frutescens*.

Para calcular as porcentagens de recuperação, foi utilizada a seguinte equação: $R(\%) = (C_s - C_o) / (C_{add}) \times 100$, em que C_s é a concentração do analito

na amostra e mais o valor adicionado, C_o é a concentração do analito na amostra e C_{add} é o quantidade de analito que foi adicionado a amostra. Os resultados encontrados variam entre 81% a 110% (Tabela 5), demonstrando que a matriz da amostra não interfere nos resultados encontrados utilizando esse método analítico.

Tabela 5 – Teste de adição/recuperação para concentrações de ácido gálico e quercetina em *C. frutescens*.

Analito	Add (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg g ⁻¹)	Recuperação (%)
Folha			
Ácido gálico	0,0	10,0	
	2,5	16,4	110
	5,0	21,7	84
Quercetina	0,0	13,2	
	5,0	26,4	90
	10,0	35,0	94
Fruto			
Ácido gálico	0,0	6,5	
	2,5	12,3	91
	5,0	17,7	81
Quercetina	0,0	4,0	
	5,0	7,1	86
	10,0	10,2	95

Aplicação

Foram analisados os extratos de frutos de *C. frutescens* em um sistema de CLAE e encontrados doze compostos fenólicos: ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol. Esses

compostos foram identificados comparando o tempo de retenção e espectro UV-visível das amostras (**Figura 12**) e dos padrões puros.

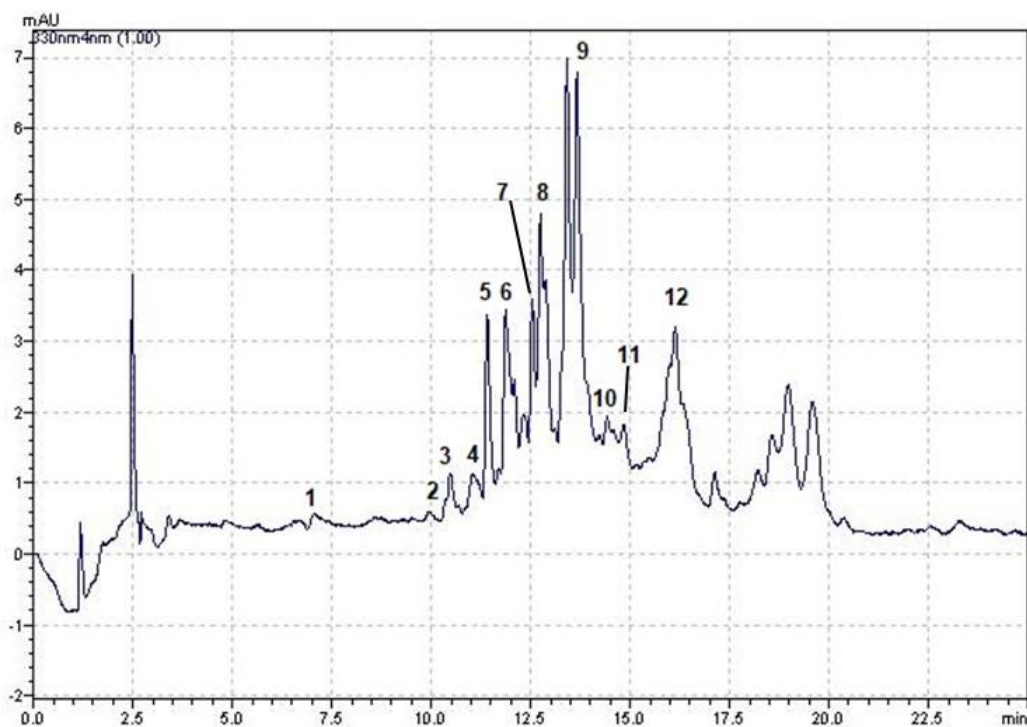


Figura 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos encontrados em *C. frutescens*. 1: ácido gálico; 2: catequina; 3: ácido clorogênico; 4: ácido cafeico; 5: ácido vanílico; 6: ácido siríngico; 7: ácido *p*-cumárico; 8: ácido ferúlico; 9: ácido elágico; 10: quercetina; 11: ácido *trans*-cinâmico; 12: kaempferol.

Foi utilizado o método para quantificar fenólicos e flavonoides totais em diferentes amostras de pimentas. Os resultados encontrados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de fenólicos e flavonoides totais em diferentes variedades de pimentas.

Variedades	Fenólicos totais (mg g ⁻¹)	Flavonoides totais (mg g ⁻¹)
Folha		
1	9,48±0,04	27,69±0,02
2	7,05±0,04	21,56±0,09
Fruto		
3	6,51±0,01	6,45±0,02
4	6,24±0,01	10,05±0,03

A quantidade de compostos fenólicos nas pimentas é diferente dependendo da parte da planta (folha; fruto) que está sendo avaliada, da espécie, do estado de maturação que se encontravam quando foram coletadas, das condições climáticas em que foram cultivadas, o que pode explicar a variação na concentração encontrada nas amostras de pimentas.

CONCLUSÃO

O planejamento Box-Benhker foi uma ferramenta eficiente para otimização do método analítico utilizando a ultrassom para extração de fenólicos e flavonoides totais, além da identificação de doze compostos fenólicos presentes em amostras de *C. frutescens*. As melhores condições de extração foram 16 mL do volume da solução extratora, 45 minutos o tempo de sonicação e 40°C a temperatura de extração para folha e 16 mL, 19,5 minutos e 53 °C para fruto. A melhor composição da mistura extratora obtida através do planejamento simplex centroide foi 93% de metanol e 7% de água para a extração de compostos fenólicos de *C. frutescens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P. M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 206-213, 2017.

BAE, H. et al. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 751-758, 2012.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, **Talanta**, v. 76, p. 965-977S, 2008.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

CASAGRANDE, M. et al. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 207-219, 2018.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008.

DENG, J. et al. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p.328-334, 2017.

DIAS, A. L. B. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 198, p. 36-44, 2017.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z. An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 243-257, 2010.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108, 2011.

FERREIRA, S. L. C. et al. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Applied spectroscopy reviews**, v. 42, n. 5, p. 475-491, 2007.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry-an overview. **Microchemical Journal**, v. 140, p. 176-182, 2018.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n.12, p. 8813-8826, 2010.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, 2006.

GOLDSMITH, C. D. et al. Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 284-290, 2018.

GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28-35, 2017.

HUANG, H. W. et al. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 1, p. 54-62, 2013.

IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P.; EKATERINIADOU, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 382-388, 2018.

IUPAC, Analytical Chemistry Division, *Spectrochimica Acta Part B*, 33 (1978) 242.

LI, J. et al. Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: an application in glutamine production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 563-571, 2007.

LLACUNA, L.; MACH, N. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. **Revista Española de Nutrición Humana y Dietética**, v. 16, n. 1, p. 16-24, 2012.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MORAES, L. P. et al. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante de Molho de Pimenta “Dedo-de-Moça” Fermentado. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 33-38, 2013.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Microwave-assisted extraction for Hibiscus sabdariffa bioactive compounds. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 156, p. 313-322, 2018.

PINTO, C. M. F.; PINTO, C. L. O.; DONZELES, S. M. L. Pimenta *Capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 2, 2013.

PUROHIT, A. J.; GOGATE, P. R. Ultrasound-assisted extraction of β -carotene from waste carrot residue: Effect of operating parameters and type of ultrasonic irradiation. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 10, p. 1507-1517, 2015.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, n. 1-2, p. 201-205, 2007.

SAHA, S. et al. Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, **Food Chemistry**, v. 177, p. 369-375, 2015.

ŠAMEC, D. et al. Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts. **Industrial crops and products**, v. 84, p. 104-107, 2016.

SANTOS, W. N. L. et al. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 583-592, 2017.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SRICHAROEN, P. et al. Phytochemicals in *Capsicum* oleoresin from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 38, p. 629-639, 2017.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in food science & technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p

WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, 2018.

ARTIGO 2

INFLUÊNCIA DE REGULADORES VEGETAIS NA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM FRUTOS DE PIMENTA MALAGUETA¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Scientia Horticulturae*, em versão na língua inglesa.

Influência de reguladores vegetais na concentração de compostos fenólicos presentes em frutos de pimenta malagueta

Resumo: Mundialmente as pimentas são utilizadas como ingrediente básico em uma grande variedade de comidas devido a seu valor nutritivo além de apresentarem compostos fenólicos, sendo eles metabolitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a condições de estresse. Vários fatores afetam a produção de compostos fenólicos na planta, e dentre eles os reguladores vegetais estão sendo muito estudados atualmente. Neste contexto, objetivou-se avaliar a influência do ABA, GA₃ e AS na produção de composto fenólicos de pimenta malagueta. O experimento foi realizado em casa de vegetação, nas dependências experimentais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. As mudas de pimenta, produzidas por sementeira, foram transplantadas para vasos de 5 dm³ contendo solo + composto orgânico. Após 118 dias de cultivo, foram aplicados os tratamentos: 10 µmol L⁻¹ de ABA, 144 µmol L⁻¹ de GA₃ e 2000 µmol L⁻¹ de AS e a testemunha (solução sem reguladores). O delineamento foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições. Para fenólicos e flavonoides totais o ABA se diferenciou da testemunha e o AS não se diferenciou. Foram quantificados doze compostos fenólicos nas amostras de fruto de *C. frutescens*: ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol. Houve aumento na síntese de ácido gálico, catequina, ácido *trans*-cinâmico e ácido ferúlico com aplicação de GA₃ e AS. A aplicação de AS demonstrou efeito inibidor na síntese de quercetina nos frutos de *C. frutescens* nas condições estudadas, já para o kaempferol, o AS teve efeito estimulador. A aplicação de reguladores vegetais (ABA, GA₃ e AS) influencia na biossíntese de compostos fenólicos em frutos de *C. frutescens*.

Palavras-chave: Compostos bioativos, *Capsicum frutescens*, fitorreguladores.

Influence of plant growth regulators in the concentration of phenolic compounds present in fruits of pepper chili

Abstract: Worldwide the peppers are used as basic ingredient in a wide variety of foods due to its nutritional value in addition to boasting phenolic compounds, they are secondary metabolites produced by plants in response to stress conditions. Several factors affect the production of phenolic compounds in plant, and among them the plant growth regulators are being much studied today. In this context, this study aimed to evaluate the influence of ABA, GA₃ and SA in the production of phenolic compound of malagueta pepper. The experiment was held in greenhouse, in experimental dependences of Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. The pepper seedlings, produced by sowing, were transplanted to pots of 5 dm³ containing soil organic compost. After 118 days of cultivation, the treatments were applied: 10 µmol L⁻¹ of ABA, 144 µmol L⁻¹ GA₃ and 2000 µmol L⁻¹ SA and the witness (solution without regulators). The experimental design was completely randomized with 6 repetitions. To phenolics and total flavonoids ABA differed from the witness and the SA non differed. Twelve phenolic compounds were quantified in the samples of fruit of *C. frutescens*: *trans*-cinnamic acid, gallic acid, quercetin, siríngico acid, ellagic acid, catechin, ferulic acid, *p*-coumaric acid, chlorogenic acid, cafeico acid, vanílico acid and kaempferol. There was an increase in the synthesis of gallic acid, catechin, *trans*-cinnamic acid and ferulic acid with application of GA₃ and SA. The application of SA showed inhibitory effect on quercetin synthesis in fruits of *C. frutescens* under the studied conditions, whereas for kaempferol, SA had stimulatory effect. The application of plant regulators (ABA, GA₃ and SA) influences the biosynthesis of phenolic compounds in fruits of *C. frutescens*.

Keywords: Bioactive compounds, *Capsicum frutescens*, phyto regulators.

INTRODUÇÃO

Mundialmente, as pimentas são utilizadas como ingrediente básico em uma grande variedade de comidas devido seu alto valor nutritivo, sendo uma excelente fonte de vitaminas e minerais (KOTHARI et al., 2010). Possuem substâncias com ação antioxidante, que podem servir para prevenir doenças degenerativas, dessas substâncias, os compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides tem destaque, sendo seus níveis variados nos frutos (CARVALHO et al., 2014).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a condições de estresse (MORALES-SOTO et al., 2013). Esses compostos tem se destacado por manifestarem resultados promissores como poderosos antioxidantes, o que tem elevado o interesse de pesquisadores (BURDA e OLESZEK, 2001; MATERSKA e PERUCKA, 2005).

A síntese de compostos fenólicos é um processo dinâmico e sua composição em diferentes partes de plantas é determinada por fatores genéticos e ambientais. O entendimento dos fatores que afetam o acúmulo de metabólitos secundários em plantas tem importância fundamental e aplicada, e o aspecto regional da pesquisa definitivamente adicionará dimensão para a discussão do papel dos metabólitos secundários e das propriedades nutracêuticas das plantas (BEREZINA, BRILKINA e VESELOV, 2017).

Os reguladores vegetais quando aplicados exógenamente proporcionam efeito semelhante aos do hormônio vegetal (VIEIRA et al., 2010), influenciando na fisiologia e morfologia das plantas, a exemplo, o ácido giberélico (GA_3), que promove alterações como alongamento e divisão nas células, floração, expansão das folhas, germinação de sementes e expressão sexual (KENDE e ZEEVAART, 1997). Já o ácido abscísico (ABA) pode regular a maturação e a dormência de sementes, promove a senescência precedendo à abscisão, regula algumas respostas a patógenos, o fechamento estomático mesmo em presença da luz impedindo as trocas gasosas, o crescimento de raízes e parte aéreas, florescimento e pode estar envolvido também no processo de maturação (LACAMPAGNE, GAGNÉ e GENY, 2010; TAIZ e ZEIGER, 2017).

O ácido salicílico (AS) é um dos compostos fenólicos mais importantes que podem atuar como regulador de crescimento, proporcionando efeitos importantes

sobre vários processos vegetais. Ele estimula a germinação de sementes, captação e transporte de cátions, atividades fotossintéticas, taxa de crescimento e respostas aos estresses abióticos (FARHANGI-ABRIZ e GHASSEMI-GOLEZANI, 2018).

Alguns trabalhos têm demonstrado o efeito dos reguladores vegetais na quantidade de compostos fenólicos como Panigrahi et al. (2017) em pimentão, Berli et al. (2010) em uva, Erogul e Sen (2015) em ameixa, Ozkan et al. (2016) em cereja, Jiang e Joyce (2003) em morango e Picoli et al. (2010) em beterraba. No entanto, informações sobre o efeito dos reguladores na síntese de compostos fenólicos de pimenta malagueta são escassas, neste sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a síntese de compostos fenólicos de frutos de *C. frutescens* submetidos a ácido giberélico, ácido abscísico e ácido salicílico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada na Região do Recôncavo Baiano, município de Cruz das Almas - BA. A mesma se encontra situada a uma altitude de 220 m, nas coordenadas geográficas 12°40'19" de Latitude Sul e 39°06'22" de Longitude Oeste. O clima é tropical quente úmido, Aw a Am, segundo a classificação de Köppen. O solo (Latosolo Amarelo Distrófico) coletado (camada de 0-20 cm) foi da área experimental da UFRB, Cruz das Almas- Bahia, o mesmo foi analisado no Laboratório de Análise de Solo, Água e Plantas cujo pH (H₂O): 6,4; P (mg dm⁻³): 0,15; K(mg dm⁻³): 7,82; Ca²⁺(cmol_c dm⁻³): 2,6; Mg²⁺(cmol_c dm⁻³): 1,9; Al trocável (cmol_c dm⁻³): 0; H + Al: 0,6 (cmol_c dm⁻³); SB: 4,52 (cmol_c dm⁻³); CTC (T): 5,12 (cmol_c dm⁻³); MO(%): 0,92; V(%): 88,28.

Insumos e preparação do experimento

Foram utilizadas sementes do lote 105214-003 s2, com 80% de germinação. A semeadura foi realizada em bandeja de plástico contendo substrato: solo + Vivatto (1:1). As mudas foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 5 dm³, os quais foram preenchidos com solo + composto orgânico (oriundas de podas de árvores e jardins, esterco bovino e caprino, relação 3:1:1) na proporção 5:1, o substrato foi analisado no Laboratório de Análise de Solo, Água e Plantas cujo pH (H₂O): 7,2; P (mg dm⁻³): 23,16; K(mg dm⁻³): 136; Ca²⁺(cmol_c dm⁻³): 8,8; Mg²⁺(cmol_c dm⁻³): 1,5; Al trocável (cmol_c dm⁻³): 0; H + Al (cmol_c dm⁻³): 1,5; SB (cmol_c dm⁻³): 10,65; CTC (T) (cmol_c dm⁻³): 12,15; MO(%): 2,07; V(%): 89,65. Foi adicionado ao substrato de acordo a análise química do mesmo, 240 Kg ha⁻¹ de P₂O₅, 180 Kg ha⁻¹ de K₂O e 60 Kg ha⁻¹ de N, nas formas de superfosfato simples, cloreto de potássio e uréia.

Delineamento experimental e tratamentos

As soluções foram preparadas em meio surfactante 0,01% (v v⁻¹) Triton X-100 e com 5% de etanol no período da tarde (16:00 horas). Aos 118 dias após a semeadura, as soluções foram pulverizadas com o pulverizador manual em toda parte aérea da planta (fruto, folhas e caule) até o escoamento, nas seguintes concentrações: 10 µmol L⁻¹ de ABA, 144 µmol L⁻¹ de GA₃ e 2000 µmol L⁻¹ de AS, e o tratamento com aplicação da solução sem os reguladores como testemunha, sendo 6 repetições, cada repetição com 2 plantas. As concentrações de cada regulador utilizado foram determinadas com base na literatura. A pulverização foi realizada no turno ameno do dia (18h00min). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Com 15 dias após a aplicação dos reguladores, os frutos foram coletados, levados para estufa a 45°C onde ficaram até massa constante, posteriormente, foram triturados em um moinho de facas e armazenados em recipientes de vidro e mantidos no congelador a 4°C até o uso.

Equipamentos e reagentes

O etanol e metanol foram adquiridos pela J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Méx., México). O reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões de ácido gálico, quercetina, ácido *trans*-cinâmico, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol são da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os cromatogramas foram obtidos a partir de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão), equipado com quatro bombas de alta pressão (LC-20AD, Shimadzu, Japão), detectores de arranjo de diodos (DAD, SPD20A, Shimadzu, Japão), interfaceados em série (CBM-20A, Shimadzu, Japão) com uma coluna RP 18 "LiChrospher" (5 µm, 4,6 × 250 mm, Agilent, Brasil) e controlada pelo software LC-System. Água ultrapura foi obtida (18,2 MΩ cm) de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Os tubos de ensaio foram sonicados em um banho ultrassônico (Elma Ultrasonic S10H®, F.: 50/ 60 Hz, P.: 90 W, Alemanha) e em seguida centrifugados em uma centrífuga durante 5 min a 1125 G.

Extração dos compostos fenólicos

Foi utilizada a metodologia desenvolvida no capítulo 1. Foram pesados 0,08 g dos frutos e adicionados 16 mL da solução extratora composta por metanol e água (93% metanol, 7% água,). As amostras foram sonicadas durante 19,5 min a 53 °C.

Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos de fruto foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão e seguiu a metodologia de Slinkard e Singleton (1977) com modificações. 400 µL do extrato da amostra e 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio foram adicionados com 300 µL de reagente de Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água destilada. Após 60 min de reação à temperatura ambiente e em ambiente escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro TECNAL® a 750 nm. Os testes foram realizados em triplicata. O teor total de compostos fenólicos foi calculado a partir da curva de calibração do ácido gálico e expresso em equivalente de ácido gálico.

Determinação dos flavonoides totais

A determinação dos flavonoides seguiu a metodologia proposta por Marques et al. (2012), 2 mL do extrato do fruto foi transferido para balões volumétricos de 10 mL, com 2,0 mL de uma solução etanólica de AlCl_3 (5%, m v^{-1}). O volume foi completado para 10 mL com uma solução hidroalcoólica (40%, v v^{-1}). Após os procedimentos esperou-se 30 min antes de realizar as leituras em um espectrofotômetro TECNAL® a 408 nm. Os testes foram realizados em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi determinado a partir da curva de calibração com padrão de quercetina e o resultado expresso em equivalente de quercetina.

Análise cromatográfica das amostras de *C. frutescens*

Ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol foram identificados por comparação com espectros padrão em cada tempo de retenção (SANTOS et al., 2017). Os extratos foram filtrados através de um filtro de 0,45 mm depois injetado no CLAE (LC-20AD Prominence, Shimadzu, Japão). A fase estacionária foi uma coluna RP 18 (5 µm, 4,6 × 250 mm) a uma temperatura de 40°C. A fase móvel foi constituída por solvente A (metanol) enquanto o solvente B uma mistura de água ultrapura acidificada com ácido acético até concentração final de 1% (v v⁻¹). O gradiente utilizado foi 0-10 min, 100% A; 10-20 min, 70% A; 20-30 min, 10% A; 30-37 min, 70% A e 37-40 min, 100% A, a um fluxo de 1 mL min⁻¹. Os compostos foram testados em diferentes comprimentos de onda (nm): 260 ácido vanílico e ácido elágico; 272 ácido siríngico; 280 ácido gálico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinâmico e catequina; 310 ácido *p*-cumárico; 330 ácido clorogênico e ácido cafeico; e 360 quercetina e kaempferol.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa estatístico computacional “R” (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019). Em função do nível de significância foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro para comparação de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que os reguladores vegetais (GA₃, ABA e AS) influenciam na síntese de fenólicos e flavonoides das plantas de *C. frutescens*.

Observa-se na Tabela 1, para fenólicos totais, que os frutos das plantas de *C. frutescens* que foram pulverizados com o ABA, GA₃ e AS não se diferenciaram entre si, sendo que o ABA e o GA₃ se diferenciaram da testemunha. A aplicação do ABA e GA₃ proporcionaram um incremento de 19,37% e 13,95% nas concentrações de fenólicos totais no fruto de *C. frutescens* quando comparados a testemunha, respectivamente. Para flavonoides totais, os frutos que receberam os reguladores (ABA, GA₃ e AS) não se diferenciaram estatisticamente entre si, sendo que só o ABA se diferenciou da testemunha, proporcionando incremento de 24,30%. Resultados semelhantes foram encontrados por Jia et al. (2017) que obtiveram aumento na produção de metabólitos secundários em planta de *Salvia miltiorrhiza* com a aplicação de ABA. Já Bagnazari et al. (2018) aumentou os compostos fenólicos em frutos de pimentão verde com aplicação de ácido giberélico, e Chen et al. (2006) concluíram que a aplicação pós-colheita de AS em bagas de uva, aumenta o acúmulo dos fenólicos.

Foram quantificados doze compostos fenólicos nas amostras de fruto de *C. frutescens*: ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, quercetina, ácido siríngico, ácido elágico, catequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico e kaempferol. Alguns desses compostos (ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, miricetina, luteolina, catequina e kaempferol) foram encontrados por Chen e Kang (2013) em pimentão vermelho (*C. annuum*). Já Morales-Soto et al. (2013) quantificaram 23 flavonoides, destacando os flavonóis, como os derivados de quercetina em cultivares de *C. annuum*. Segundo Bae et al. (2012) os derivados de miricetina, quercetina, luteolina, apigenina e kaempferol são encontrados na maioria das pimentas. A diferença na composição fenólica relatada deve-se principalmente ao ambiente de cultivo das plantas, a espécie, ao estado de maturação dos frutos avaliados e as condições experimentais de extração.

Tabela 1 – Concentração dos compostos fenólicos de frutos de *C. frutescens* submetidos a diferentes reguladores vegetais (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ABA, 144 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GA₃ e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS) em Cruz das Almas, BA, 2018.

Variáveis	Tratamentos				CV (%)
	Testemunha	ABA	GA ₃	AS	
Fenólicos totais (mg g ⁻¹)	14,11 b	17,50 a	16,21 a	15,94 ab	7,81
Flavonoides totais (mg g ⁻¹)	5,73 b	7,57 a	6,69 ab	6,55 ab	11,32
Ác. elágico (mg g ⁻¹)	2,44	-	2,11	2,83	-
Kaempferol (mg g ⁻¹)	0,93	-	0,96	1,16	-
Ác. gálico (mg g ⁻¹)	0,90	-	1,33	1,18	-
Ác. ferúlico (mg g ⁻¹)	0,79	-	1,00	1,07	-
Catequina (mg g ⁻¹)	1,33	-	3,00	2,38	-
Ác. <i>trans</i> -cinâmico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	22,20	-	24,07	44,48	-
Quercetina (mg g ⁻¹)	0,10	-	0,09	-	-
Ác. clorogênico (mg g ⁻¹)	0,13	-	0,14	0,13	-
Ác. vanílico (mg g ⁻¹)	1,61	-	1,59	1,69	-
Ác. siríngico (mg g ⁻¹)	0,32	-	0,32	0,29	-
Ác. <i>p</i> -cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	56,56	-	54,89	65,19	-
Ác. cafeico (mg g ⁻¹)	0,07	-	0,12	0,17	-

Letras diferentes na linha se diferenciaram entre si pelo teste Tukey a 5%.

Foram encontradas concentrações maiores de ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, ácido ferúlico, kaempferol e catequina com a aplicação dos reguladores vegetais GA₃ e AS. Já

para o ácido elágico, as maiores concentrações foram encontradas nos frutos das plantas da testemunha e AS. Não foi determinado quercetina nos frutos das plantas sob o tratamento AS, mas foi determinado na testemunha, indicando que o AS possivelmente teve um efeito inibidor na biossíntese da quercetina nas condições estudadas, o que não ocorreu com a aplicação de GA₃. Esses resultados confirmam o efeito elicitor dos reguladores na produção de metabólitos secundários, assim como outros autores confirmaram (KOVÁČIK et al., 2012; SARDOEI et al., 2014; VILLALOBOS-GONZÁLEZ et al., 2016; MURCIA et al., 2017; NAPOLEÃO et al., 2017; PANIGRAHI et al., 2017).

Os resultados encontrados possivelmente tem relação com a influencia que os reguladores podem ter em enzimas atuantes no metabolismo secundário das plantas (VIEIRA et al., 2010; HUANG et al., 2016), pois os mesmos podem induzir a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese e metabolismo dos fenilpropanóides. A via fenilpropanóide é importante no metabolismo secundário dos vegetais, os principais produtos produzidos incluem fitoalexinas, ácidos fenólicos e precursores importantes, como as chalconas (TAN et al., 2016), que são responsáveis por condensa *p*-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, sendo a condensação fundamental para a produção de flavonoides (CAMPOS et al., 2003).

O ácido elágico, catequina e o ácido vanílico foram os composto majoritário encontrado nas amostras de frutos de *C. frutescens*, além disso, a biossíntese dos mesmos foi estimulada pelos reguladores, demonstrando que o GA₃ e o AS podem ser utilizados como elicitores na produção desses compostos em frutos de *C. frutescens*, compostos esses importantes no tratamento e prevenção de várias doenças, como as cardiovasculares e câncer, que podem ser prevenidas com a ingestão de ácido elágico (LARROSA et al., 2010). Já a catequina é um flavonoide que tem demonstrado efeitos benéficos em estudos de diabetes, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral e obesidade (JANEIRO e BRETT, 2004; SINGH, SHANKAR e SRIVASTAVA, 2011). O ácido vanílico é um derivado do ácido benzóico usado como agente aromatizante, anti-inflamatórios, hepatoprotetor, entre outros (KIM et al., 2010).

As resposta específicas dos compostos á pulverização do ABA, GA₃ e AS pode estar relacionada com as diferentes rotas metabólicas e enzimas envolvidas

na biossíntese dos mesmos, além disso, os efeitos proporcionados pelos reguladores depende da concentração utilizada e do órgão em que foi aplicado, da técnica de aplicação, da fase fenológica e dos níveis internos desses reguladores nas plantas estudadas.

CONCLUSÃO

A aplicação de reguladores vegetais (ABA, GA₃ e AS) influencia na síntese de compostos fenólicos em frutos de *C. frutescens*. Há um aumento na síntese de ácido gálico, catequina, ácido *trans*-cinâmico e ácido ferúlico com aplicação de GA₃ e AS. A aplicação de AS inibe a síntese de quercetina nos frutos de *C. frutescens* nas condições estudadas, já para o kaempferol, o AS tem efeito estimulador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGNAZARI, M. et al. Pre-harvest CaCl₂ and GA₃ treatments improve postharvest quality of green bell peppers (*Capsicum annum* L.) during storage period. **Scientia horticulturae**, v. 240, p. 258-267, 2018.

BAE, H. et al. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 751-758, 2012.

BEREZINA, E. V.; BRILKINA, A. A.; VESELOV, A. P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 139-146, 2017.

BERLI, et al. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1–10, 2010.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CAMPOS, Â. D. et al. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.

CARVALHO, A. V. et al. Mudanças nos compostos bioativos e atividade antioxidante de pimentas da região amazônica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 4, 2014.

CASTRO, A. H. F., et al. Avaliação sazonal da atividade fenilalanina amonia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima erbasifolia* Rich. Ex A. Juss.: Uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 7, p. 45-55, 2005.

CHENG, S.H. et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v.503, n.2/3, p.185-8, 2001.

CHEN, J. et al. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 1, p. 64-72, 2006.

CHEN, L.; KANG, Y. Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: comparison of pericarp and placenta extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1724-1731, 2013.

EROGUL, D.; SEN, F. Effects of gibberellic acid treatments on fruit thinning and fruit quality in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 137-142, 2015.

FARHANGI-ABRIZ, S.; GHASSEMI-GOLEZANI, K. How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 1010-1016, 2018.

HUANG, Y. et al. The effects of GA and ABA treatments on metabolite profile of germinating barley. **Food Chemistry**, v. 192, p.928-933, 2016.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica chimica acta**, v. 518, n. 1-2, p. 109-115, 2004.

JIA, Y. et al. The protein kinase SmSnRK2. 6 positively regulates phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* by interacting with SmAREB1. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1384, 2017.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 171–174, 2003.

KENDE, H.; ZEEVAART, J.A.D. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, Baltimore, v.9, n.7, p.1197-1210, 1997.

KIM, S. et al. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7208-7217, 2010.

KOTHARI, S. L. et al. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 35-48, 2010.

KOVÁČIK, J. et al. Effect of metabolic regulators on aluminium uptake and toxicity in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 140-148, 2012.

LACAMPAGNE, S.; GAGNÉ, S.; GÉNY, L. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 1, p. 81-90, 2010.

LARROSA, M. et al. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, n. 6, p. 513-539, 2010.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1750- 1756, 2005.

MORALES-SOTO, A. et al. High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. **Food research international**, v. 51, n. 2, p. 977-984, 2013.

MURCIA, G. et al. ABA and GA₃ regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. **Phytochemistry**, v. 135, p.34-52, 2017.

NAPOLEÃO, T. A. et al. Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. **Plant Science**, v. 263, p. 46-54, 2017.

OZKAN, Y. et al. Pre-harvest gibberellic acid (GA₃) treatments play an important role on bioactive compounds and fruit quality of sweet cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 358-362, 2016.

PANIGRAHI, J. et al. Gibberellic acid coating: A novel approach to expand the shelf-life in green chilli (*Capsicum annuum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 581-588, 2017.

PICOLI, A. A. et al. Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 983-988, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**, 2019. Disponível em < <https://www.r-project.org/> >. Acesso em 9 de março de 2019.

SANTOS, W. N. L. et al. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 583-592, 2017.

SARDOEI, A. S. et al. Effects of gibberellic acid (GA₃) on phenolic compounds and antiradical activity of marigold (*Calendula officinalis*). **International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 3, p. 80-84, 2014.

SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

TAN, B. A. et al. Expression of phenylpropanoid and flavonoid pathway genes in oil palm roots during infection by *Ganoderma boninense*. **Plant Gene**, v. 7, p. 11-20, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p

VIEIRA, E. L. et al. **Manual de fisiologia vegetal**. São Luis: Edufma, 2010. 230 p

VILLALOBOS-GONZÁLEZ, L. et al. Long-term effects of abscisic acid (ABA) on the grape berry phenylpropanoid pathway: gene expression and metabolite content. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 213-223, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi otimizado um método de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos em amostras de frutos e folhas de *C. frutescens*, a fim de obter extração mais eficiente em menos tempo. E também foi realizado um estudo sobre a aplicação de reguladores vegetais em *C. frutescens*, que contribuiu com informações sobre os compostos fenólicos presentes em seus frutos e sobre o efeito que o GA₃, ABA e AS tem sobre a síntese desses compostos. Para obtenção de mais informações sobre os efeitos desses reguladores, é interessante o estudo com diferentes concentrações de cada um.

ANEXO

Tabela 1 – Compostos fenólicos determinados em amostras de *C. frutescens* pulverizadas com reguladores vegetais.

Tratamentos	Ft* (mg g ⁻¹)	Fl (mg g ⁻¹)	Van (mg g ⁻¹)	Ela (mg g ⁻¹)	Sir (mg g ⁻¹)	Clo (mg g ⁻¹)	Caf (mg g ⁻¹)
T	16,90±1,05	7,03±3,39	1,10±0,05	2,55±0,37	<LQ	0,20±0,02	0,11±0,0005
T	13,65±2,58	5,43±1,76	0,99±0,11	2,46±0,40	<LQ	0,01±0,004	<LQ
T	13,61±4,64	5,26±0,55	1,12±0,33	2,59±0,89	0,26±0,02	0,12±0,03	0,02±0,006
T	12,80±3,88	5,48±0,31	0,97±0,09	2,84±0,23	0,41±0,03	0,13±0,02	0,02±0,0003
T	14,96±5,18	5,59±1,25	3,05±0,29	1,98±0,45	0,29±0,07	0,11±0,01	0,14±0,0008
T	12,76±3,14	5,57±1,54	2,44±0,05	2,21±0,86	0,33±0,09	0,18±0,02	0,06±0,006
GA ₃	14,88±2,30	5,66±2,19	0,91±0,12	1,84±0,36	0,31±0,13	0,12±0,03	0,12±0,007
GA ₃	14,51±3,94	6,51±2,17	0,85±0,16	2,01±0,55	0,45±0,10	0,15±0,02	0,15±0,02
GA ₃	16,50±5,54	6,90±0,54	1,08±0,05	1,77±0,37	0,36±0,10	0,18±0,03	0,14±0,01
GA ₃	16,87±5,37	7,17±0,59	1,17±0,01	2,67±0,30	0,25±0,03	0,14±0,02	0,12±0,005
GA ₃	16,36±3,51	7,42±0,73	2,74±0,61	2,25±0,65	0,24±0,08	0,13±0,04	0,12±0,004
GA ₃	18,17±2,92	6,49±1,38	2,81±0,45	2,12±0,17	<LQ	0,14±0,008	0,08±0,02
AS	16,30±5,45	4,92±1,27	1,32±0,11	2,98±0,36	0,41±0,09	0,12±0,03	0,11±0,007
AS	16,26±3,09	6,01±1,57	1,70±0,04	2,16±0,88	0,34±0,07	0,15±0,02	0,44±0,03
AS	15,66±2,98	6,25±0,61	2,65±0,01	3,06±0,77	0,15±0,02	0,12±0,01	0,09±0,004
AS	15,19±2,91	7,41±3,03	0,97±0,02	2,72±0,08	0,36±0,03	0,11±0,01	0,11±0,001
AS	16,36±4,87	7,02±1,38	1,83±0,67	2,62±0,39	0,21±0,09	0,13±0,02	0,10±0,004
AS	15,87±6,78	7,71±1,49	1,68±0,46	3,42±0,28	0,27±0,14	0,13±0,01	0,17±0,009
ABA	15,79±7,04	6,57±2,98	-	-	-	-	-
ABA	17,70±9,64	8,00±2,20	-	-	-	-	-
ABA	19,08±3,33	7,23±0,61	-	-	-	-	-
ABA	18,77±1,85	8,07±1,53	-	-	-	-	-
ABA	16,42±5,11	8,13±1,34	-	-	-	-	-
ABA	17,22±2,78	7,41±0,69	-	-	-	-	-

*Ft: fenólicos totais; Fl: flavonoides totais; Van: ácido vanílico; Ela: ácido elágico; Sir: ácido siríngico; Clo: ácido clorogênico; Caf: ácido cafeico.

Continuação da Tabela 1 – Compostos fenólicos determinados em amostras de *C. frutescens* pulverizadas com reguladores vegetais.

Tratamentos	Quer* (mg g ⁻¹)	Kae (mg g ⁻¹)	Gal (mg g ⁻¹)	Cat (mg g ⁻¹)	Fer (mg g ⁻¹)	Cum (µg g ⁻¹)	Cin (µg g ⁻¹)
T	0,11±0,01	0,98±0,03	0,94±0,07	1,76±0,13	<LQ	67,16±5,30	22,81±3,96
T	0,09±0,01	0,97±0,0006	1,01±0,13	0,89±0,006	<LQ	64,55±1,00	<LQ
T	0,11±0,01	0,88±0,11	0,72±0,09	<LQ	0,78±0,04	46,23±0,06	<LQ
T	0,12±0,01	0,93±0,001	0,94±0,006	<LQ	0,88±0,001	57,31±1,74	<LQ
T	0,06±0,01	0,84±0,04	0,98±0,07	<LQ	0,83±0,002	65,57±16,76	<LQ
T	0,08±0,005	0,96±0,06	0,78±0,02	<LQ	0,68±0,05	38,53±2,43	21,59±4,09
GA ₃	0,09±0,007	0,83±0,05	1,52±0,35	<LQ	0,97±0,09	50,70±0,21	25,18±0,25
GA ₃	0,06±0,001	0,73±0,07	1,28±0,10	<LQ	0,91±0,02	50,29±8,41	29,62±2,12
GA ₃	0,10±0,009	1,07±0,10	1,49±0,02	<LQ	1,20±0,01	53,68±3,96	17,44±0,01
GA ₃	0,10±0,001	0,87±0,09	1,16±0,01	<LQ	1,08±0,008	61,63±1,72	<LQ
GA ₃	<LQ	1,19±0,40	1,56±0,05	3,24±0,23	0,84±0,13	61,07±1,39	<LQ
GA ₃	<LQ	1,09±0,05	0,96±0,005	2,75±0,11	0,96±0,05	51,95±0,28	<LQ
AS	<LQ	1,17±0,11	1,47±0,01	2,49±0,11	0,98±0,08	54,62±0,41	<LQ
AS	<LQ	<LQ	0,97±0,05	2,59±0,25	1,16±0,09	83,44±5,97	<LQ
AS	<LQ	<LQ	0,95±0,12	2,39±0,42	1,08±0,02	57,11±0,44	<LQ
AS	<LQ	<LQ	1,11±0,03	2,20±0,19	1,12±0,04	43,13±5,32	<LQ
AS	<LQ	<LQ	1,24±0,03	2,50±0,35	0,90±0,09	73,89±8,33	40,02±0,45
AS	<LQ	1,15±0,18	1,35±0,22	2,08±0,22	1,21±0,13	78,93±23,65	48,94±5,41
ABA	-	-	-	-	-	-	-
ABA	-	-	-	-	-	-	-
ABA	-	-	-	-	-	-	-
ABA	-	-	-	-	-	-	-
ABA	-	-	-	-	-	-	-
ABA	-	-	-	-	-	-	-

*Quer: quercetina; Kae: kaempferol; Gal: ácido gálico; Cat: catequina; Fer: ácido ferúlico; Cum: ácido *p*-cumárico; Cin: ácido *trans*-cinâmico.