

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

Allana Brunna Sucupira Duarte

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO β -CAROTENO EXTRAÍDO
DO PIMENTÃO VERMELHO (*Capsicum annuum L.*) EM CREMES PELO MÉTODO
DPPH**

Cuité

2015

Allana Brunna Sucupira Duarte

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO β -CAROTENO EXTRAÍDO
DO PIMENTÃO VERMELHO (*Capsicum annuum L.*) EM CREMES PELO MÉTODO
DPPH**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande UFCG/CES, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Juliana de Souza Alencar Falcão

Cuité
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

D812a Duarte, Allana Brunna Sucupira.

Avaliação da atividade antioxidante do β -caroteno extraído do pimentão vermelho (*Capsicum annum L.*) em cremes pelo método DPPH. / Allana Brunna Sucupira Duarte. – Cuité: CES, 2015.

42 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientadora: Juliana de Souza Alencar Falcão.

1. β -caroteno. 2. Pimentão vermelho. 3. DPPH. I. Título.

CDU 634.1

Allana Brunna Sucupira Duarte

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO β -CAROTENO EXTRAÍDO
DO PIMENTÃO VERMELHO (*Capsicum annuum L.*) EM CREMES PELO MÉTODO
DPPH**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande UFCG/CES, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Juliana de Souza Alencar Falcão
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Jacqueline do Carmo Barreto

Prof. Dr. Marciano Henrique de Lucena Neto

DEDICATÓRIA

A Deus, que pela sua força infinita, sempre atendeu as minhas preces e permitiu que eu mais uma vez, vencesse mais uma etapa da minha vida.

A minha mãe Benedita, pelo amor incondicional que esta sempre me dedicou e por me apoiar em todas as fases da minha vida.

Ao meu tio Antônio, por sempre acreditar no meu potencial me apoiando e dando força, sem nunca medir esforços para que eu conseguisse realizar todos os meus sonhos.

A minha irmã Andressa, pelo carinho e atenção nas horas em que precisei de apoio e compreensão, dando-me a certeza de sempre poder contar com sua amizade e companheirismo.

As minhas tias Irene, Socorro e Nita minha eterna gratidão. Sem elas eu não alcançaria essa vitória, pois, sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos amigos de Sousa e Cuité por compartilharem momentos tão importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Posso me congratular por ter recebido o apoio de muitas pessoas, amigos, colegas e mestres, que me ajudaram e que são em parte responsáveis pelo bom termo a que chegou este trabalho. Agradeço a todos, e mesmo correndo o risco da omissão de nomes, agradeço especialmente:

A Deus que esteve, está e sempre estará abençoando meu caminho;

A professora e orientadora Juliana de Souza Alencar Falcão, pelo incentivo, disponibilidade, apoio e confiança;

Aos professores do Curso Bacharelado em Farmácia da UFCG por todos os ensinamentos durante a graduação;

A funcionária Glória Batista pela amizade, carinho, disponibilidade e por me acompanhar nos experimentos sempre me auxiliando quando necessário;

Ao colega Cláudio Dantas, pela ajuda com as análises cromatográficas, parte crítica do trabalho de laboratório;

A todos os amigos da turma, mas especialmente, Natânia, Luciana, Arthur, Jesyka Thaís, Nayr, Jessika Ventura e Alan por compartilhar experiências e pela ótima convivência ao longo desses anos;

As minhas amigas Bruna, Aretusa e Ana Clara, por toda cumplicidade, amor, amizade, e família que construímos em Cuité durante esses anos;

E por último, porque em destaque, agradeço à minha família, mas, em especial a minha mãe Benedita, meu tio Antônio, minhas tias Irene, Socorro e Nita e a minha irmã Andressa pelo amor incondicional e apoio em todas as fases da minha vida.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

Os pigmentos carotenóides presentes no pimentão vermelho *Capsicum annum L.* apresentam um grande potencial antioxidante e representam uma perspectiva promissora na prevenção do fotoenvelhecimento. O objetivo deste trabalho foi extrair, isolar e purificar o β -caroteno presente no pimentão vermelho para a elaboração de um creme e posteriormente, avaliar o potencial antioxidante deste sobre o radical livre DPPH. Os resultados obtidos indicaram que após extração, isolamento e purificação, o extrato contendo o β -caroteno apresentou uma massa inicial de 60 μg que após evaporação do solvente a temperatura ambiente resultou em 20 μg de β -caroteno. O creme placebo (F1) contendo apenas a base de cera lanette não apresentou nenhum efeito sobre o radical DPPH. O β -caroteno padrão e o creme contendo o β -caroteno padrão (F2) ambos na concentração de 0,3 mM apresentaram o mesmo comportamento antioxidante até uma concentração de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, reduzindo em 30,43 % o efeito do radical DPPH. Essa concentração foi limitante nos resultados obtidos, pois em altas concentrações do β -caroteno padrão observou-se um aumento das absorbâncias no comprimento de onda analisado (516 nm). Já o creme contendo β -caroteno extraído do pimentão vermelho (F3) na concentração de 0,3 mM apresentou capacidade de eliminar o radical DPPH em 0,82% não ocorrendo aumento nas absorbâncias em 516 nm devido ao seu menor grau de pureza quando comparado ao do β -caroteno padrão. A vitamina C foi utilizada como produto de referência e reagiu imediatamente com o radical DPPH, apresentando maior capacidade de eliminar o radical DPPH que os demais. Os resultados dessa pesquisa enaltecem a importância dos produtos naturais demonstrando que os mesmos também podem apresentar indicativos de atividade antioxidantes além de possuírem como maior vantagem, o uso reduzido de substâncias sintéticas causadores de reações cutâneas e alérgicas, porém, é necessário que estudos posteriores sejam realizados para que estes produtos possam adentrar ao mercado consumidor.

Palavras chave: pimentão vermelho, β -caroteno, DPPH.

ABSTRACT

The carotenoid pigments present in red pepper *Capsicum annum L.* present a great antioxidant potential and represent a promising perspective for the prevention of photoaging. The objective of this study was to extract, isolate and purify the β -carotene present in red chili for the preparation of a cream and subsequently evaluate the potential of this antioxidant on the free radical DPPH. The results indicated that after extraction, isolation and purification, the statement containing the β -carotene showed an initial mass of 60 μg that after evaporation of the solvent at room temperature resulted in 20 mg of β -carotene. The placebo cream (F1) containing only lanette wax base had no effect on the DPPH radical. The standard β -carotene and the standard cream containing β -carotene (F2) at the concentration of 0,3 mM showed the same behavior antioxidant at a concentration of 120 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$, reducing the effect of 30,43% radically DPPH. This concentration was limiting the results, because in high standard β -carotene concentrations observed an increase in absorbance in the analyzed wavelength (516 nm). But the cream containing β -carotene extracted from red pepper (F3) at a concentration of 0,3 mM showed ability to eliminate DPPH radical in 0,82% no increase in absorbance at 516 nm due to its lower degree of purity when compared the standard β -carotene. Vitamin C was used as the reference product and immediately reacted with DPPH radical, with greater capacity to eliminate the DPPH radical than the others. The results of this research extol the importance of natural products show that the same may also present indicative of antioxidant activity besides having as main advantage, the reduced use of synthetic substances cause of skin and allergic reactions, however, it is necessary that further studies be conducted so that these products can enter the consumer market.

Keywords: red peppers, β -carotene, DPPH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pimentão vermelho (<i>Capsicum annum L.</i>).....	15
Figura 2 - Forma estrutural plana do β -Caroteno	16
Figura 3 - Estrutura molecular da Criptoxantina	16
Figura 4 - Estruturas moleculares contendo quarenta átomos de carbono: (A) Capsantina e (B) Capsorubina	17
Figura 5 - Reações de Carotenóides e radicais livres	19
Figura 6 - Estabilização do radical livre DPPH.....	19
Figura 7 - Extrato do pimentão vermelho obtido após maceração.....	28
Figura 8 - Eluição do extrato obtido a partir do pimentão vermelho contendo carotenóides..	29
Figura 9 - Placa de cromatografia contendo o β -caroteno padrão (A) e β -caroteno extrato (B) após eluição.....	30
Figura 10 - Isolamento e purificação do β -caroteno em coluna cromatográfica.....	31
Figura 11 - Varredura do β -caroteno padrão $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em Clorofórmio.....	32
Figura 12 - Curva analítica do β -caroteno padrão em clorofórmio no comprimento de onda de 470 nm.....	32
Figura 13 - Cremes com β -caroteno padrão (A) e com β -caroteno extraído do pimentão (B) a 0,3 mM	33
Figura 14 - Varredura do DPPH ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em metanol	34
Figura 15 - Curva analítica do DPPH em metanol no comprimento de onda de 516 nm	35
Figura 16 - Mistura de β -caroteno padrão com DPPH.....	36
Figura 17 - Concentrações de β -caroteno (padrão e extrato), placebo e Vitamina C padrão versus absorvância do DPPH (N=3).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das Formulações.....	26
Tabela 2 - Percentual de atividade antioxidante (método DPPH) de diferentes amostras, contendo β -caroteno (padrão, extrato e creme) e vitamina C.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

BHT - Butil hidroxi tolueno

CCD - Cromatografia em camada delgada

ext. - extrato

ROO - radical

CAR - carotenóide

p.a - padrão analítico

β - beta

abs - absorbância

μg - micrograma

mM - milimolar

μL - microlitro

$\lambda_{\text{máx}}$ - comprimento de onda máximo

nm - nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	Pimentão vermelho	15
2.1.1	Constituintes antioxidantes do pimentão vermelho.....	15
2.1.2	Características físico-químicas dos componentes	17
2.1.3	Atividade antioxidante dos componentes.....	18
2.2	Método DPPH	19
2.3	Cosméticos verdes	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Material	22
4.1.1	Substâncias e solventes.....	22
4.1.2	Equipamentos	22
4.1.3	Vidrarias e utensílios diversos	22
4.2	Metodologia	23
4.2.1	Obtenção do extrato.....	23
4.2.2	Cromatografia em camada delgada (CCD)	23
4.2.3	Isolamento e purificação do β -caroteno	24
4.2.4	Espectrofotometria de varredura do β -caroteno	24
4.2.5	Quantificação do β -caroteno.....	24
4.2.6	Formulação dos cremes	25
4.2.7	Espectrofotometria de varredura do DPPH	26
4.2.8	Método DPPH	26
4.2.8.1	Curva padrão para o DPPH	26

4.2.8.2	Aplicação do método DPPH.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são moléculas extremamente reativas derivadas do metabolismo celular que podem causar diversos danos ao organismo como o processo de envelhecimento da pele (SILVA et al., 2009). Para contrapor aos efeitos negativos ocasionados pelos radicais, existe uma grande variedade de antioxidantes que atuam inibindo ou reduzindo os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio promovendo assim, o rejuvenescimento da pele (STEINER, 2008).

Nos anos 80, deu-se início a pesquisas com antioxidantes naturais extraídos de vegetais com o intuito de substituir totalmente ou parcialmente os antioxidantes sintéticos em formulações farmacêuticas (OLIVEIRA, 2011). Aplicados topicamente ou oralmente, os antioxidantes de origem natural como: ácido ascórbico, carotenóides e a vitamina E apresentam uma perspectiva promissora de prevenção do fotoenvelhecimento pelo fato de atuarem em benefício à saúde e de serem mais potentes que os antioxidantes sintéticos. (STEINER, 2008).

Para que os antioxidantes naturais sejam incorporados em produtos farmacêuticos, é necessário que sua atividade antioxidante seja avaliada e comprovada. Atualmente, existem diversas técnicas para se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dessas substâncias envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (ALVES et al., 2010).

Dentre os diversos métodos para se avaliar atividade antioxidante *in vitro*, cabe destaque para o método baseado no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Esse teste se baseia na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical reduzindo-o a hidrazina que apresenta coloração amarela (ALVES et al., 2010). O teste DPPH é um método rápido, prático e com boa estabilidade podendo ser utilizado para avaliar atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (SUCUPIRA et al., 2012).

Este trabalho tem como objetivos extrair o β -caroteno do pimentão vermelho (*Capsicum annum L.*) e, em seguida, incorporá-lo à formulação de um creme e posteriormente, avaliar a atividade antioxidante dos constituintes pelo método DPPH.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pimentão vermelho

O gênero *Capsicum* possui cerca de 27 espécies porém, *Capsicum annum L.* é a espécie mais cultivada no mundo (SILVA, 2007). O pimentão vermelho (Figura 1) é uma planta arbustiva originária do continente americano pertence à família *Solanaceae* e seus frutos são utilizados na fabricação de condimentos, conservas e molhos (CARVALHO et al., 2011).

Cultivada em todo o território brasileiro, é considerada uma das dez hortaliças de maior importância econômica nacional, tendo como principal região produtora e consumidora o Sudeste (ECHER, 2002).

Além do consumo *in natura* ou processado, os frutos do pimentão vermelho tem efeito nutracêutico devido à presença de carotenóides que atuam como antioxidantes naturais, auxiliando na eliminação de radicais livres (FILHO, 2010). Os carotenóides podem ser utilizados industrialmente como corantes ou substâncias bioativas em rações, cosméticos, alimentos e fármacos (SOUZA, 2012).



Figura 1 - Pimentão vermelho (*Capsicum annum L.*)

Fonte: < <http://www.extraplus.com.br/produto/8472-pimentao-vermelho-kg>>

2.1.1 Constituintes antioxidantes do pimentão vermelho

A coloração do pimentão vermelho (*Capsicum annum L.*) deve-se, à presença de carotenóides tais como: carotenos, criptoxantinas, capsantinas e capsorubina (RIBEIRO;

NUNES, 2008). Os carotenóides são pigmentos naturais que não são produzidos pelo organismo humano e, sua presença no organismo se deve à alimentação e à ingestão de suplementos contendo esses compostos. (FONTES, 2013).

Precusores da vitamina A, os carotenos (Figura 2) possuem propriedade antioxidante devido, à sua capacidade de serem convertidos pelo organismo em retinol que é a forma ativa da vitamina A (FONTES, 2013). Entre estes, o β -caroteno é o mais estudado e proposto como um protetor solar oral devido a sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio geradas nos processos foto-oxidativos (CORREIA, 2012).

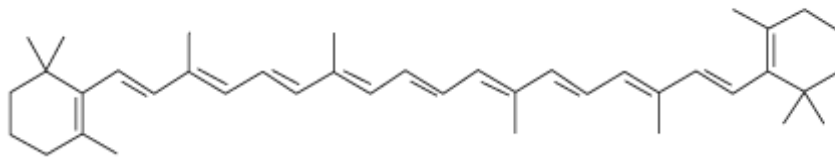


Figura 2 - Forma estrutural plana do β -Caroteno.

Fonte: TRÊS et al., 2007.

A β -criptoxantina (Figura 3) é uma xantofila (composta de carbono, hidrogênio e oxigênio) que apresenta estrutura semelhante ao β -caroteno. Embora o β -caroteno apresente uma maior atividade pró-vitamina A, essa xantofila também desempenha o papel de pró-vitamina (PACHECO et al., 2012).

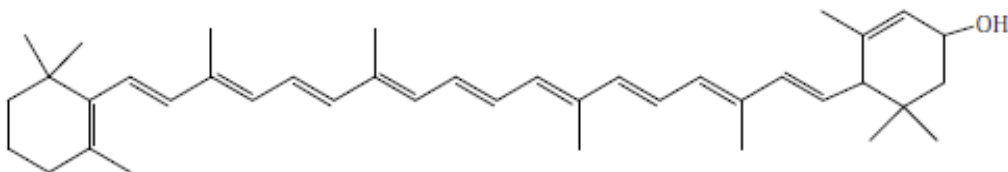


Figura 3 - Estrutura molecular da Criptoxantina.

Fonte: FREITAS et al., 2012.

Os carotenóides polioxygenados tais como as capsantinas (Figura 4A) e capsorubina (Figura 4B) contêm em suas estruturas um e dois anéis acil-ciclo-pentanol e são os principais responsáveis pela coloração vermelha do pimentão (*Capsicum annum L.*). Essas xantofilas representam 65-80% da coloração total do pimentão e são utilizadas em diversas linhas de

produtos alimentícios processados como molhos, sopas em pó de preparo instantâneo, embutidos de carne, principalmente salame e salsicha. (GOMES, 2012).

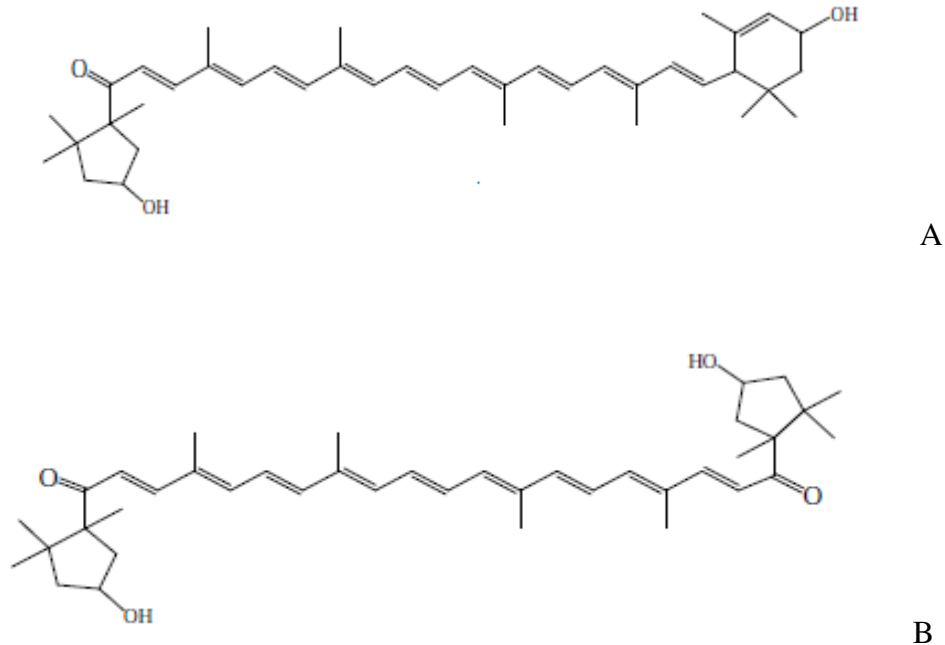


Figura 4 - Estruturas moleculares contendo quarenta átomos de carbono: (A) Capsantina e (B) Capsorubina.

Fonte: FREITAS et al., 2012.

2.1.2 Características físico-químicas dos componentes

Os pigmentos carotenóides são lipossolúveis, portanto, são insolúveis em água e, solúveis em solventes orgânicos como éter, acetona, metanol, hexano e clorofórmio. A sua natureza lipofílica permite que esses compostos geralmente, sejam encontrados nas membranas, porém podem estar associados a proteínas e estar presente no meio aquoso (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; TRÊS et al., 2007).

Apresentam estabilidade na faixa de pH entre 3,0 e 7,0 contudo, alguns carotenóides não resistem a extremos de pH podendo sofrer isomerização cis/trans de certas duplas ligações (MORAIS, 2006).

A cadeia de polienos é o grande responsável pela instabilidade dos carotenóides que oxidam com muita facilidade na presença de luz, calor e compostos pró-oxidantes que estão susceptíveis a sofrer autooxidação intensa resultando em descoloração e perda da atividade biológica (MORAIS, 2006).

A cor dos carotenóides é de grande importância analítica uma vez que uma mudança de cor durante a análise é indicativo de degradação estrutural. A cor também pode controlar a sua separação cromatográfica em coluna e em camada delgada (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007).

2.1.3 Atividade antioxidante dos componentes

Os radicais livres são moléculas que apresentam elétrons não pareados em sua órbita externa e sua produção ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e, pela exposição a fatores externos como cigarro, medicamentos e radiações ultravioleta (SILVA et al., 2009; SILVA, et al., 2010).

A formação desses radicais livres é importante para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais, como por exemplo, na resposta imunológica, porém a alta reatividade dessas moléculas podem causar danos oxidativos às células e tecidos contribuindo para o aparecimento de doenças como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer, aterosclerose, problemas pulmonares bem como, aceleram o processo de envelhecimento humano (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Para amenizar os danos ocasionados pelos radicais livres o organismo utiliza como defesa os antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático. O enzimático é composto pelas enzimas: catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase. Já o sistema não enzimático inclui os compostos que são sintetizados pelo organismo como: bilirrubina, ceruloplasmina, ácido úrico, coenzima Q e outros que são ingeridos através da dieta como: vitamina E, ácido ascórbico e carotenóides (OLIVEIRA, 2011; SCHNEIDE; OLIVEIRA, 2004).

Os pigmentos carotenóides são excelentes desativadores de radicais livres, sendo capazes de sequestrar espécies reativas como o oxigênio singlete e o radical peroxil estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância. A atividade antioxidante desses compostos está diretamente ligada a sua estrutura acíclica composta de nove ou mais duplas ligações conjugadas que interagem sobre as espécies reativas de três maneiras diferentes (Figura 4): transferência de elétrons, remoção de íons de hidrogênio ou adição de espécies radicalares, respectivamente Equações 1, 2 e 3 (MORAIS, 2006).

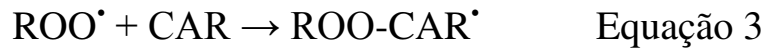
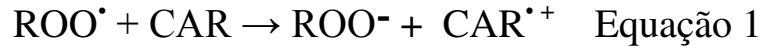


Figura 5 - Reações de Carotenóides e radicais livres.

Legenda: ROO• radical; CAR carotenóide. Fonte: YOUNG; LOVE, 2011

2.2 Método DPPH

Existem diversos métodos para se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos e substâncias isoladas. Dentre os testes mais utilizados temos o método baseado no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um radical de nitrogênio orgânico que apresenta estabilidade e coloração violeta, devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (ALVES et al., 2010).

Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorbância (Figura 6). O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico (SANTOS et al., 2007).

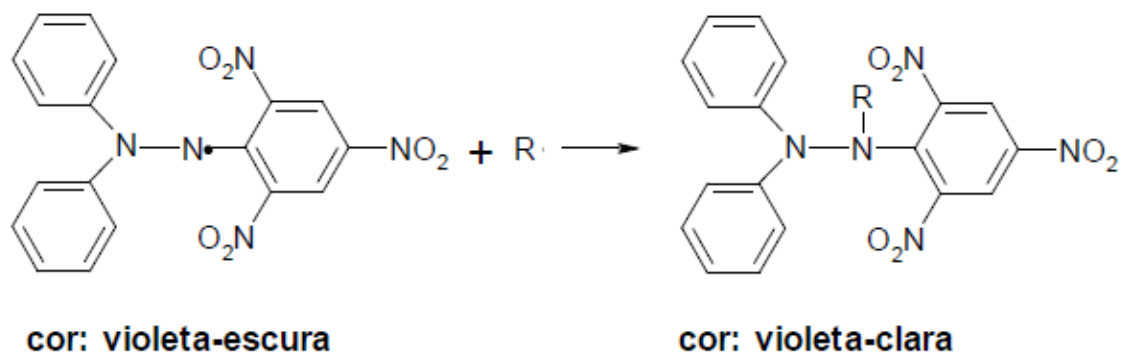


Figura 6 - Estabilização do radical livre DPPH

Fonte: Rufino et al., 2007

Esse teste tem sido muito utilizado para avaliar a atividade antioxidante por se tratar de um método rápido, prático, com boa estabilidade que, pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (SUCUPIRA et al., 2012).

2.3 Cosméticos verdes

Cosméticos são preparações farmacêuticas constituídas por substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicados no corpo humano com a finalidade de limpá-lo e protegê-lo. Os cosméticos também podem promover o embelezamento através de produtos como: perfumes, maquiagem, esmaltes, cremes para a pele, desodorantes dentre outros (BARBIZAN et al., 2013).

O Brasil é um dos maiores consumidores de cosméticos do mundo e diante desta situação, os fabricantes vêm buscando uma qualidade cada vez maior bem como, uma inovação em seus produtos (ABIHPEC, 2009). Prova disso é o interesse por parte de empresas e consumidores nacionais e internacionais por ingredientes que envolvam recursos da biodiversidade brasileira para a produção de cosméticos verdes (SEBRAE, 2008).

Os cosméticos verdes são produtos naturais e orgânicos produzidos a partir de extratos de plantas e ingredientes de origem vegetal. Esses cosméticos não apresentam em sua formulação substâncias sintéticas como: polietilenoglicóis, quartenários de amônio, derivados do petróleo e corantes sintéticos que são potenciais causadores de reações cutâneas e alérgicas justificando-se assim, a preferência dos consumidores por esses produtos (BARBIZAN et al., 2013; HIGUCHI, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante do β -caroteno extraído do pimentão vermelho em cremes pelo método DPPH.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair, isolar e purificar o β -caroteno do pimentão vermelho;
- Elaborar o creme com o β -caroteno;
- Avaliar a atividade antioxidante do β -caroteno padrão e dos cremes contendo β -caroteno padrão e β -caroteno extrato, utilizando o método DPPH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Substâncias e solventes

- Hexano - (Impex);
- Acetona - (Impex);
- Placa de cromatografia em camada delgada - (Macherey-Nagel);
- Sulfato de sódio anidro - (Isofar Ltda);
- Sílica - (Macherey-Nagel);
- Cera lanette - (Farmos Ltda)
- Butil hidroxi tolueno (BHT) - (Farmos Ltda)
- Nipazol - (Isofar Ltda);
- Propilenoglicol - (Codossal Ltda);
- Água destilada;
- Metilparabeno (Nipagin) - (Codossal Ltda);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) - (Química Contemporânea Ltda);
- Álcool metílico - (Química Contemporânea Ltda);
- 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) - (Sigma);
- β -caroteno - (Sigma);
- Ácido ascórbico - (Neon);

4.1.2 Equipamentos

- Balança Analítica - (Bioprecisa FA-2104N);
- Balança semi-analítica - (Bioprecisa, JH2102));
- Agitador tipo vórtex - (AP59, Phoenix);
- Espectrofotômetro UV/VIS - (Biospectro SP-220);

4.1.3 Vidrarias e utensílios diversos

- Capilar;
- Bastões de vidro;
- Béqueres de 50, 250 e 600 mL;
- Cubetas de quartzo;

- Coluna de vidro;
- Suporte universal;
- Filtro de papel;
- Funis de vidro;
- Proveta;
- Balão volumétrico 100 mL e 1.000 mL;
- Pipeta automática (10 1000 μ L);
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL).

4.2 Metodologia

4.2.1 Obtenção do extrato

A extração foi realizada seguindo o método descrito por Ribeiro; Nunes (2008), onde 800 g de pimentões foram picados em pedaços pequenos e pesados aos quais, foram adicionados 60 mL hexano:acetona 5:1. A mistura foi macerada em gral de porcelana com pistilo por cerca de 1 hora.

Após esse período, a mistura foi filtrada em funil comum com papel de filtro pregueado. Após a filtração, as duas fases formadas foram separadas com o auxílio de um funil de separação. A fase superior de interesse foi adicionada sulfato de sódio anidro que, após filtração foi concentrada em banho-maria mantido a 70 °C e sob agitação.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi realizada segundo o método descrito por Ribeiro; Nunes (2008) em que a cuba cromatográfica foi preparada num béquer com tampa e contendo um pedaço de papel de filtro embebido com fase móvel com sistema eluente hexano: acetona (95:5), deixando a atmosfera interna do recipiente saturada com vapores da fase móvel para facilitar a eluição cromatográfica. Posteriormente, o concentrado resultante extraído do pigmento do pimentão vermelho foi aplicado em uma placa revestida com sílica fase normal e com auxílio de um capilar, duas gotas da amostra foram aplicadas em dois pontos diferentes da placa. Após a evaporação do solvente, a placa foi posicionada na cuba

cromatográfica de modo que o nível da fase móvel ficasse abaixo do ponto onde a amostra havia sido aplicada. Em seguida o extrato aplicado na placa foi eluído.

Para identificação do β -caroteno extraído, também foi utilizada a cromatografia em camada delgada, utilizando β -caroteno padrão para comparação. Numa placa revestida com sílica gel 60 fase normal com dimensões de 2,0 por 5,0 cm foi aplicada uma gota de β -caroteno padrão e ao outro lado da mesma placa uma gota de β -caroteno extrato. Posteriormente, a placa foi eluída, utilizando o mesmo sistema eluente e foi calculado o fator de retenção (R_f) de ambos de acordo com a Equação 4.

$$R_f = \frac{d_s}{d_m} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

d_s : Distância percorrida pela substância em questão

d_m : Distância percorrida pela fase móvel

4.2.3 Isolamento e purificação do β -caroteno

A técnica foi adaptada de Freitas et al. (2012) onde o extrato contendo carotenóides foi submetido a cromatografia em coluna. O empacotamento da coluna foi realizado utilizando-se, uma coluna de vidro aberta na extremidade superior e munida de uma torneira na extremidade inferior foi presa na posição vertical com auxílio do suporte universal. Em seguida, a coluna foi empacotada com sílica gel 60 fase normal e, o extrato contendo carotenóides foi colocado na coluna e posteriormente, foi adicionado hexano com o intuito de isolar e purificar o β -caroteno dos demais carotenóides.

4.2.4 Espectrofotometria de varredura do β -caroteno

A varredura por espectrofotometria do β -caroteno padrão foi realizada entre 450 nm a 500 nm com o objetivo de identificar o comprimento de onda de absorção máxima.

4.2.5 Quantificação do β -caroteno

O método de quantificação foi adaptado de Zeraik; Yariwake (2008) onde foi utilizado β -caroteno padrão como referência. Para a construção de uma curva analítica, inicialmente foi preparada uma concentração de β -caroteno padrão de $200 \mu\text{g/mL}^{-1}$ em clorofórmio. A partir desta solução foram preparadas por diluição, soluções de concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 e $2 \mu\text{g/mL}^{-1}$. A concentração de β -caroteno total do extrato de pimentão foi calculada pela equação da reta, obtida através do gráfico da curva analítica.

4.2.6 Formulação dos cremes

Para a formulação da base foram utilizados: água, cera lanette, BHT, nipazol, nipagin, EDTA e propilenoglicol.

A princípio, foi realizado o cálculo do qsp de água (somar a quantidade de todas as substâncias e diminuir dos 50 mL de água). Posteriormente, todas as substâncias foram pesadas separadamente com o auxílio da balança analítica e, a quantidade de água foi medida numa proveta de 50 mL. O Nipagin foi aquecido em um béquer com um pouco de água destilada medida na proveta. Este aquecimento ocorreu até a sua total dissolução.

Todos os componentes da fase B (aquosa) foram acrescentados num béquer de 250 mL que foi levado ao aquecimento agitando sempre com bastão de vidro. Quando esta fase atingiu aproximadamente, a temperatura de 65°C todos os componentes da fase A (oleosa), foram colocados em outro béquer de 250 mL para aquecer.

Quando as duas fases atingiram 75°C , a fase B (aquosa) foi adicionada sobre a fase A (oleosa). Após a inversão de fases, a formulação foi levada imediatamente para o agitador mecânico e ficou mantida sob agitação constante até atingir a temperatura ambiente.

Após o preparo da base (F3), foram manipulados três formulações de cremes (Tabela 1) aos quais foram incorporados o β -caroteno padrão, β -caroteno extraído do pimentão vermelho; ambos na concentração de 0,3 mM. Essa concentração foi embasada no trabalho realizado por Alencar et al. (2008) que utilizou sesamol na concentração de 0,3 mM e o mesmo, inativou o radical DPPH.

Tabela 1 - Preparo das Formulações

Formulações	F1 (%m/m)	F2(%m/m)	F3(%m/m)
Composição			
β -caroteno padrão	-	0,00080	-
β -caroteno extrato	-	-	0,00080
Cera Lanette	7,5	7,5	7,5
BHT	0,015	0,015	0,015
Propilenoglicol	3	3	3
Nipazol	0,01	0,01	0,01
Nipagin	0,075	0,075	0,075
EDTA	0,03	0,03	0,03
Água (qsp.)	50 mL	50 mL	50 mL

Fonte: Autoria própria.

4.2.7 Espectrofotometria de varredura do DPPH

A espectrofotometria de varredura do DPPH foi realizada entre 510 a 520 nm com o intuito de identificar o comprimento de onda de absorção máxima.

4.2.8 Método DPPH

4.2.8.1 Curva padrão para o DPPH

A curva padrão para o DPPH foi adaptada de Nascimento et al. (2011) no qual, preparou-se uma solução metanólica de DPPH a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, foram feitas diluições dessa solução para obtenção de diferentes concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Foram feitas as leituras das absorbâncias das soluções em triplicata, utilizando-se metanol como branco. Foi construída a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorbâncias obtidas x concentração da solução.

4.2.8.2 Aplicação do método DPPH

Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2008) onde foram preparadas soluções clorofórmicas de β -caroteno padrão, creme de β -caroteno padrão e creme de β -caroteno extrato (0,3 mM) e, uma solução aquosa de vitamina C (0,3 mM) utilizado como padrão. Alíquotas de (75 μ L - 750 μ L) com estas soluções foram adicionadas a 1500 μ L de uma solução estoque de DPPH a 75 μ g/mL, e foi adicionado clorofórmio para ajustar o volume final da amostra para 2250 μ L e, no caso da solução com vitamina C água destilada foi adicionada para ajustar o volume final da amostra. A absorbância do DPPH foi então determinada a 516 nm 3 minutos após adição do β -caroteno padrão, cremes de β -caroteno e vitamina C. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a Equação 5:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle(-)}}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$A_{\text{controle(-)}}$ = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

A_{amostra} = absorbância da amostra com o DPPH

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato

De 800g de pimentões pesados, resultaram cerca de 30 mL de extrato concentrado contendo carotenóides (Figura 7), valor superior à quantidade obtida por Ribeiro; Nunes (2008) que utilizou apenas 30g de pimentão vermelho resultando em apenas 1 mL de extrato concentrado. A quantidade de pimentão utilizado foi aumentada para que fosse possível o isolamento do β -caroteno dos demais carotenóides. Posteriormente, a manipulação do creme contendo o β -caroteno foi realizada.



Figura 7 - Extrato do pimentão vermelho obtido após maceração.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Ao analisar o cromatograma, percebe-se que os pigmentos carotenóides foram separados em função da sua polaridade (Figura 8). O β -caroteno é um hidrocarboneto apolar e

possui pouca afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel contendo hexano:acetona (95:5); percorrendo assim, uma maior distância na placa cromatográfica. A criptoxantina apresenta apenas uma hidroxila tendo, portanto, moderada afinidade com a fase estacionária utilizada na pesquisa e durante a eluição distancia-se moderadamente do ponto de aplicação da amostra. As capsantinas e a capsorubina são substâncias polioxigenadas e, portanto, tendo uma maior afinidade pela fase estacionária distanciando-se pouco do ponto de aplicação da amostra os resultados encontrados na pesquisa corroboram com os encontrados por Ribeiro; Nunes (2008) e por Freitas et al. (2012).



Figura 8 - Eluição do extrato obtido a partir do pimentão vermelho contendo carotenóides.

Fonte: Autoria própria.

O β -caroteno padrão e o β -caroteno extrato percorreram a placa cromatográfica lado a lado (Figura 9) e apresentaram o mesmo R_f de 0,75 identificando assim, que naquele extrato realmente existe o β -caroteno e que o mesmo realmente foi separado dos demais carotenóides. O comportamento do β -caroteno padrão e do β -caroteno extrato na cromatografia em camada

delgada coincide com o relatado por Ribeiro; Nunes (2008) e por Freitas et al. (2012) o que é justificado devido ao seu carácter apolar e consequentemente, sua maior afinidade pela fase móvel.

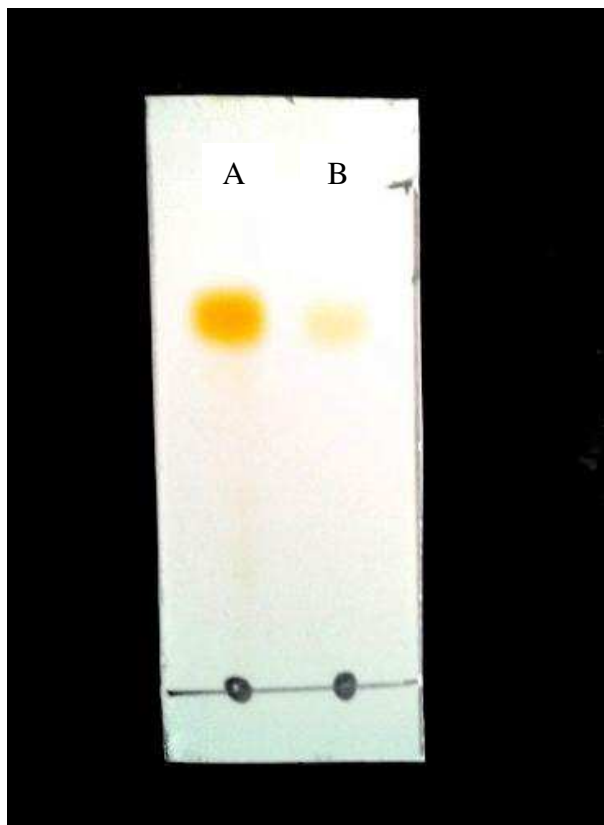


Figura 9 - Placa de cromatografia contendo o β -caroteno padrão (A) e β -caroteno extrato (B) após eluição.

Fonte: Autoria própria.

5.3 Isolamento e purificação do β -caroteno

Devido ao carácter apolar do β -caroteno, este foi isolado e purificado dos demais carotenóides, utilizando 100% hexano (Figura 10). O β -caroteno isolado apresentou uma massa inicial de 60 μg que após evaporação do solvente a temperatura ambiente resultou em 20 μg de β -caroteno. Na literatura, Freitas et al. (2012) também isolou o β -caroteno do pimentão vermelho usando 100% de hexano porém, a quantidade de pimentão utilizada pelo autor foi de apenas 30g o que resultou em uma quantidade inferior de β -caroteno quando comparada a obtida pela pesquisa.



Figura 10 - Isolamento e purificação do β -caroteno em coluna cromatográfica.

Fonte: Autoria própria.

5.4 Espectrofotometria de varredura do β -caroteno

O β -caroteno apresentou máxima absorção no comprimento de onda de 470 nm (Figura 11) um valor aproximado ao encontrado por Zeraik; Yariwake (2008) onde foi observada uma banda com comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) em 460 nm, característica das duplas ligações conjugadas do β -caroteno.

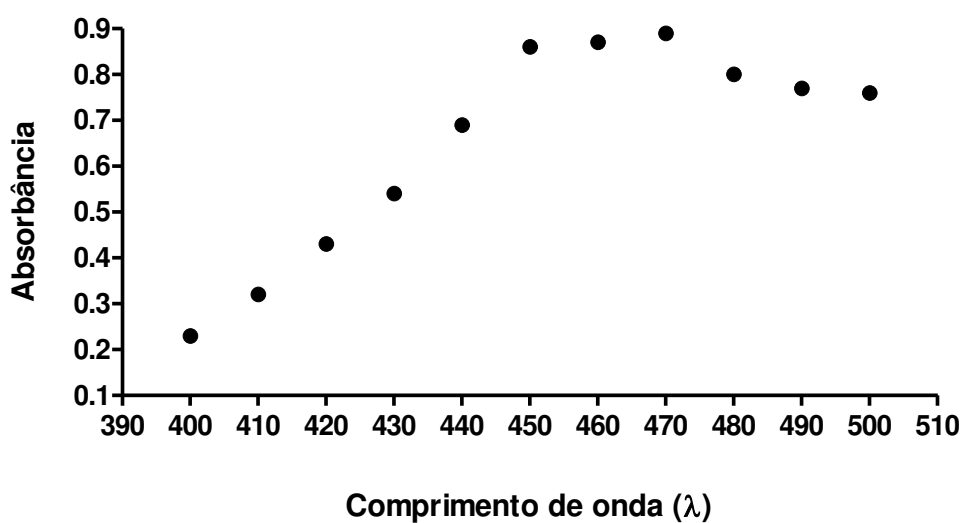


Figura 11 - Varredura do β -caroteno padrão $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em Clorofórmio.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 Quantificação do β -caroteno

O gráfico (Figura 12) apresentou equação da reta ($\text{abs} = 0,4257x + 0,06415$) onde x representa a concentração de β -caroteno. A equação da reta apresentou coeficiente de linearidade $R^2 = 0,9991$. O β -caroteno (ext.) apresentou uma absorvância de 0,80 nm cuja concentração correspondeu a $1,72 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

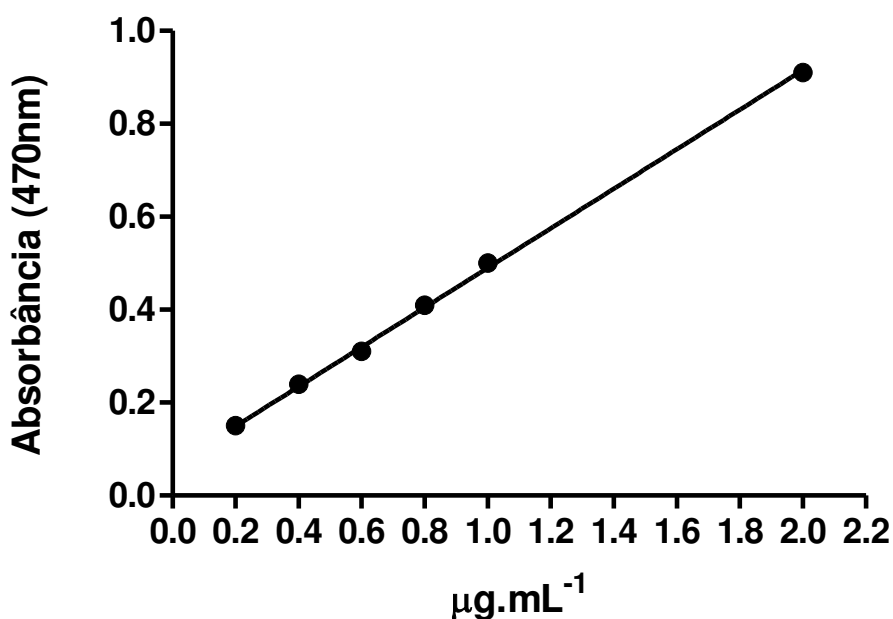


Figura 12 - Curva analítica do β -caroteno padrão em clorofórmio no comprimento de onda de 470 nm.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.6 Formulações dos cremes

Por se tratar de um produto natural o β -caroteno extraído do pimentão vermelho apresenta menor grau de pureza quando comparado ao β -caroteno padrão. Devido a isso, o creme contendo o β -caroteno extraído apresentou uma coloração amarelada indicando, que mesmo tendo sido pesada a mesma quantidade de extrato de β -caroteno e de β -caroteno padrão para a formulação dos cremes (Figura 13), a concentração presente no creme contendo β -caroteno padrão é maior devido ao seu alto grau de pureza e isto é representado pela coloração avermelhada de seu creme.



Figura 13 - Cremes com β -caroteno padrão (A) e com β -caroteno extraído do pimentão (B) a 0,3 mM.

Fonte: Autoria própria.

5.7 Espectrofotometria de varredura do DPPH

O radical DPPH apresentou absorção máxima no comprimento de onda de 516 nm (Figura 14) valor aproximado ao encontrado na literatura nos trabalhos realizados por Nascimento et al. (2011) e Alencar et al. (2008) que trabalharam respectivamente com o comprimento de onda de 515 nm e 517 nm.

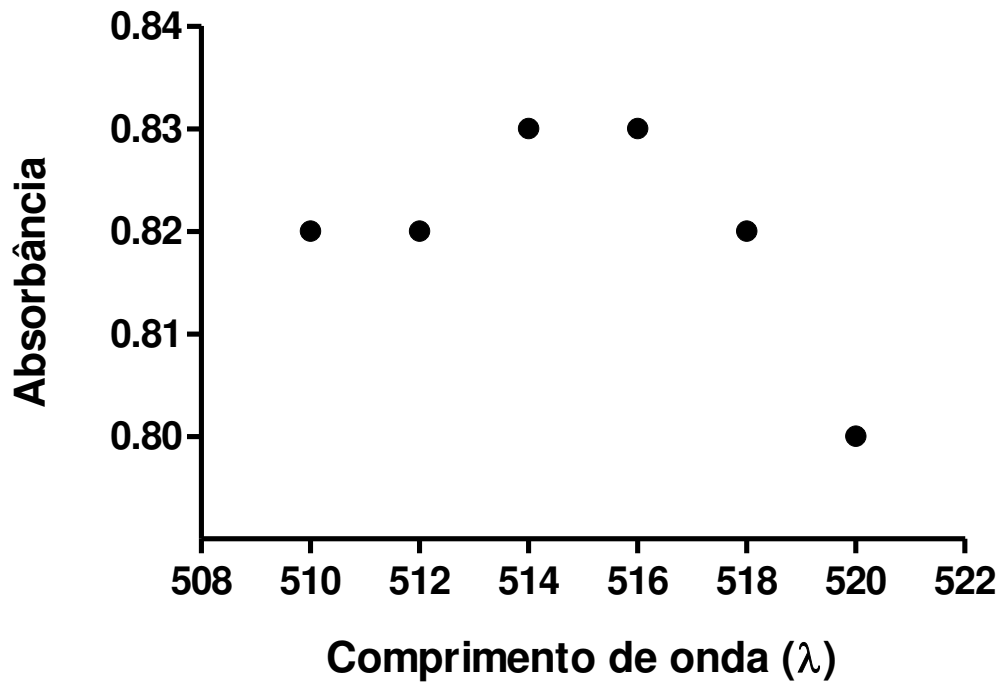


Figura 14 - Varredura do DPPH ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em metanol.

Fonte: Dados da Pesquisa.

5.8 Método DPPH

5.8.1 Curva padrão para o DPPH

O gráfico (Figura 15) refere-se à curva de calibração empregada para o experimento DPPH cuja equação da reta ($\text{abs} = 0,01987x - 0,03067$) onde x representa a concentração de DPPH. A equação da reta apresentou coeficiente de linearidade $R^2 = 0,9992$ e coeficiente de correlação ($r = 0,9995$).

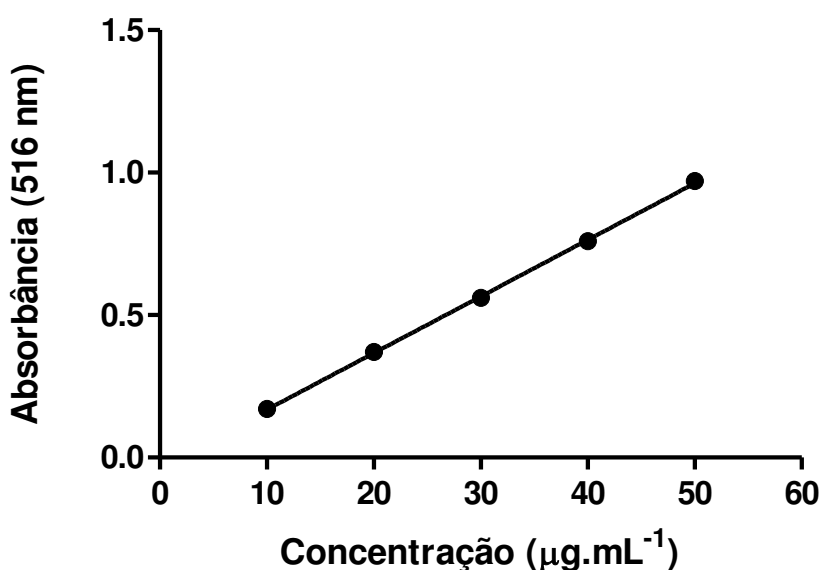


Figura 15 - Curva analítica do DPPH em metanol no comprimento de onda de 516 nm.

Fonte: Autoria própria.

5.8.2 Aplicação do método DPPH

Conforme a (Tabela 2), o creme placebo não apresentou nenhuma capacidade de eliminar o radical DPPH, o β -caroteno padrão e o creme de β -caroteno padrão praticamente apresentaram o mesmo efeito sobre o radical DPPH até a concentração de $120 \mu\text{g/mL}^{-1}$ após isso, o espectro do β -caroteno se sobrepôs ao do DPPH e não foi mais possível calcular a % de atividade antioxidante. Essa interferência entre β -caroteno padrão e o DPPH é citada na literatura nos trabalhos de Liu et al.(2008) e Alves et al.(2010).

O creme de β -caroteno (ext.) apresentou uma menor % de atividade antioxidante quando comparado ao β -caroteno padrão por esse último apresentar alto grau de pureza.

A vitamina C padrão apresentou uma maior % de atividade antioxidante quando comparado aos demais e reagiu imediatamente com o radical.

Tabela 2 - Percentual de atividade antioxidante (método DPPH) de diferentes amostras, contendo β -caroteno (padrão, extrato e creme) e vitamina C

Composição das amostras	Concentração de ativo ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	(%) atividade antioxidante
Creme placebo	-	-
β -caroteno padrão	26 – 120	8.80 – 30.39
Creme β -caroteno padrão	26 – 120	8.82 – 30.43
Creme β -caroteno extrato	26 – 210	1.96 – 8.82
Vitamina C padrão	26 – 210	16.60 – 93.13

Fonte: Dados da pesquisa.

O creme placebo não apresentou redução nas absorvâncias à medida que sua concentração foi aumentada, indicando que a base não apresenta nenhum efeito sobre o radical DPPH.

O β -caroteno padrão e o creme contendo o β -caroteno padrão apresentaram queda nas absorvâncias (efeito sobre o radical) até a concentração de $120 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de β -caroteno padrão. Ao ultrapassar essa concentração a mistura de β -caroteno padrão com DPPH adquiriu uma cor castanho escuro (Figura 16), e ocorreu um aumento nas absorvâncias, pois, o espectro do β -caroteno se sobrepôs ao do DPPH gerando interferência nas leituras de absorvância a 517 nm. Este mesmo comportamento também foi relatado nos trabalhos de Liu et al.(2008) e Alves et al.(2010).



Figura 16 - Mistura de β -caroteno padrão com DPPH.

Fonte: Autoria própria.

O creme de β -caroteno extrato apresentou um pequeno efeito sobre o radical DPPH e isso é representado por uma pequena queda nas absorvâncias, esse comportamento é explicado devido a sua menor concentração quando comparado ao creme β -caroteno padrão e essa menor concentração justifica-se, pois o mesmo trata-se de um produto natural que mesmo sendo purificado dos demais carotenóides pode apresentar outros constituintes que não podem ser identificados por CCD. Por apresentar menor grau de pureza o creme de β -

caroteno (ext.) não apresentou aumento na absorção quando comparado ao β -caroteno padrão que apresenta um grau de pureza elevado.

A vitamina C padrão reagiu imediatamente com o radical DPPH resultando em queda nas absorbâncias o mesmo comportamento foi observado no trabalho de Liu et al. (2008). Portanto, diferente do β -caroteno padrão a vitamina C padrão não apresentou nenhuma interferência com o radical DPPH que resultou em aumento da absorbância, todos esses comportamentos acima citados podem ser representados na (Figura 17).

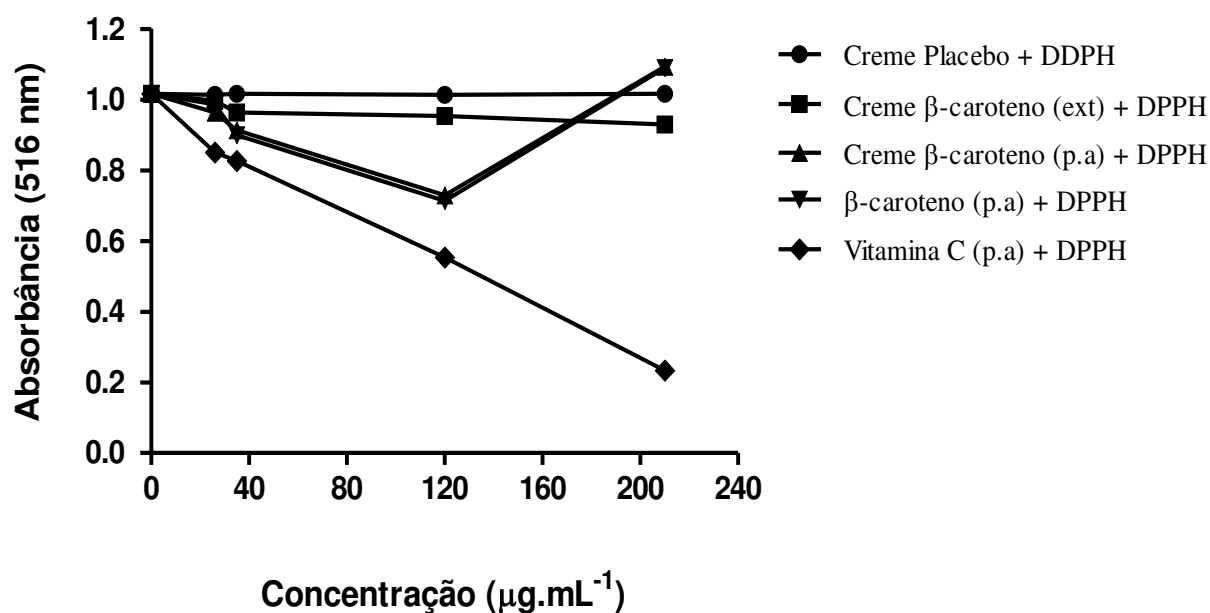


Figura 17 - Concentrações de β -caroteno (padrão e extrato), placebo e Vitamina C padrão versus absorbância do DPPH (N=3).

Fonte: Dados da pesquisa.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais obtidos neste trabalho conclui-se que é possível a elaboração de um creme de β -caroteno extraído do pimentão vermelho e que, o mesmo, apresentou efeitos antioxidantes *in vitro* ao atuar sobre o radical DPPH.

Os resultados obtidos nesta pesquisa enaltecem a importância dos produtos naturais demonstrando que os mesmos também podem apresentar indicativos de atividade antioxidante, além de possuírem como maior vantagem, o uso reduzido de substâncias sintéticas causadores de reações cutâneas e alérgicas.

Entretanto, existem diversos fatores que limitam o uso de produtos naturais dentre eles, o baixo rendimento e grau de pureza dos extratos. É necessário que sejam utilizadas outras técnicas como espectrometria de massa, infravermelho, calorimetria exploratória diferencial (DSC) que possam indicar o grau de pureza do ativo. Também, é importante avaliar a estabilidade do extrato obtido, pois o mesmo pode ter sido degradado no momento da extração ou manipulação da formulação. Isto permite que a pesquisa seja aprimorada e a população venha a se beneficiar com o uso de cosméticos verdes.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em <http://www.abihpec.org.br/conteudo/Panorama2009_Portugues.pdf>. Acessado em: 27 de setembro de 2014.
- ALENCAR, J. et al. Development of spray- and freeze-dried high-concentration sesamol emulsions and antioxidant evaluation in fibroblasts and UV-exposed rat skin slices. **Drug Development Research**, França, v. 69, n.5, p. 251-266, ago. 2008.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, Bahia, v.33, n.10, p. 2202-2210, out. 2010.
- BARTIZAN, F.; FERREIA, E.C.; DIAS, I.L.T. Sabonete em barra produzido com de óleo de oliva (*olea uropaeal.*) como proposta para o desenvolvimento de cosméticos verdes. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 9, n. 1, p. 116-127, mar./maio, 2013.
- CARVALHO, J. A. et al. Análise produtiva e econômica do pimentão-vermelho irrigado com diferentes lâminas, cultivado em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.6, p.569–574, mar. 2011.
- CORREIA, A. P. **Nutracêuticos para aplicação cosmética**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- Disponível em: <<http://www.extraplus.com.br/produto/8472-pimentao-vermelho-kg>>. Acessado em: 2 de fevereiro de 2015.
- ECHER, M.M. et al. Avaliação de genótipos de *Capsicum* para resistência ao ácaro branco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n. 2, p.217-221, jun. 2002.
- FILHO, J. G. S. **Diversidade dos pigmentos e do gene codificador da capsantina-capsorubina sintase (Via biossintética dos carotenóides) em quatro espécies do gênero *Capsicum L.*** 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília DF, 2010.

FONTES, I. J. G. **Antioxidantes como substâncias cosmetologicamente activas**. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

FREITAS, J. C. R.; De Freitas, J. J. R.; Silva, L. P.; De Freitas, J. R.. Extração e separação cromatográfica de pigmentos de pimentão vermelho: experimento didático com utilização de materiais alternativos. **Revista Brasileira de Ensino de Ciência e Tecnologia** v.5, n. 1, jan./abr. 2012.

GOMES, L.M.M. **Inclusão de carotenóides de pimentão vermelho em β -ciclodextrina e avaliação da sua estabilidade, visando aplicação em Alimentos**. 2012. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

HIGUSHI, C.T. O uso racional de cosméticos e o seu descarte consciente e apelo do uso por produtos de origens orgânica e natural. **Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**. Resenha, v.8, n.3, 2013.

LIU, D. et al. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and b-carotene mixtures on the DPPH free radical. **LWT - Food Science and Technology**, Canada, v.41, n.7, set. 2008.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v.57, n.2, jun. 2007.

MORAIS, F. L. **Carotenóides: características biológicas e químicas**. 2006. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Qualidade de Alimentos) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2006.

NASCIMENTO, J.C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Belo Horizonte, v. 92, n. 4, p. 327-332, nov. 2011.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.*** 2011. 81f. Dissertação. (Mestrado em Alimentos e nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

PACHECO, S. et al. Obtenção de Padrões de cis-licopeno e β -criptoxantina para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a Partir de melão-de-São-Caetano e caqui. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, Rio de Janeiro, v.14, n.2, p. 81-86, 2012.

RIBEIRO, N.M.; NUNES, C.R. Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 29, p. 34-37, 2008.

RUFINO, M.S.M.; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Julho, 2007.

SANTOS, M.H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.3, p. 604-610, julho, 2007.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Cosméticos: a base de produtos naturais. **Relatório**. 2008. Disponível em < www.sebrae.com.br/ >. Acessado em: 24 setembro 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Porto Alegre, v. 10, n. 4, p. 308-313, jul./ago. 2004.

SILVA, M.P. **Aspectos clássicos e moleculares no melhoramento de pimentão visando à resistência à mancha bacteriana**. 2014. 90f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, F. C.; RIBEIRO, R. C.; CHAVES, A. C. L. Radicais livres e antioxidantes: concepções e expectativas dos professores do ensino médio. In: VII Encontro Nacional de

Pesquisa em Ensino de Ciências, 2009, Florianópolis. **Anais do VII Encontro Nacional de Pesquisas em Educação em Ciências**, Florianópolis, 2009, p. 1-12.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SOUZA, R.M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde**. 2012. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

STEINER, D. Antioxidantes em Cosméticos. **Cosmetics and Toiletries**, v. 20, n. 4, p.36, mar./abr. 2008.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A.B.; COSTA, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ceará, v.14, n. 4, p. 263-269, maio, 2012.

TRÊS, M. V. et al. Influência da temperatura na solubilidade de b-caroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 737-743, out./dez. 2007.

YOUNG, A.J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.385, n.1, p. 20-27, 2001.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J.H. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.5, p. 1259-1262, abril, 2008.