

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM EXTRATO DE *CAPSICUM
BACCATUM* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)**

NATHÂNIA DE SÁ MENDES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2016**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM EXTRATO DE *CAPSICUM
BACCATUM* POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)**

NATHÂNIA DE SÁ MENDES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal com ênfase em Química de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

192/2016

Mendes, Nathânia de Sá

Validação de método para determinação de substâncias fenólicas em extrato de *Capsicum baccatum* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) / Nathânia de Sá Mendes. – Campos dos Goytacazes, 2016.

142 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira.

Área de concentração: Química de alimentos.

Bibliografia: f. 78-99.

1. *Capsicum baccatum* 2. METODO CROANALITICO 3.

SUBSTÂNCIA FENÓLICA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Tecnologia de Alimentos II. Título

CDD 635.643

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS EM EXTRATO DE *CAPSICUM
BACCATUM* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)**

NATHÂNIA DE SÁ MENDES

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Aprovada em de Março de 2016

Comissão Examinadora:

Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D. Sc. em Fitotecnia) UENF - RJ

Prof^a. Luana Pereira de Moraes (D.S., Engenharia de Alimentos) UENF - RJ

Prof^a. Renata Gomes de Brito Mariano (D.S., Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) IFF - RJ

Prof^a. Daniela Barros de Oliveira (Orientadora) (D.S., Química de Produtos Naturais) UENF - RJ

Dedico...

*A Deus, aos meus pais Hélio e Suzete,
aos meus irmãos Tauana e Helisson.
Minha gratidão!*

"Suba o primeiro degrau com fé

Não é necessário que você

Veja toda a escada

Apenas dê o primeiro passo".

Martin Luther King

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

Filipenses 4.13

Agradecimentos

Deus por nunca ter me abandonado, sempre ter guiado e iluminado os meus caminhos e por ter a oportunidade de concluir mais uma etapa em minha vida;

Aos meus pais, Hélio e Suzete, pelo apoio incondicional, orações e por todos os valiosos ensinamentos;

Aos meus irmãos Tauana e Helisson, pelo apoio prestado, pela compreensão e por acreditar na minha força de trabalho;

A UENF pela oportunidade do curso e por disponibilizar a infraestrutura para a realização do trabalho;

A FAPERJ, pelo suporte financeiro;

À prof^a Daniela Barros de Oliveira, pelo exemplo, orientação, paciência e principalmente, pelos ensinamentos a mim transmitidos durante a realização deste projeto;

Aos professores Geraldo de Amaral Gravina, Luana Pereira de Moraes e Renata Gomes de Brito Mariano por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) pela parceria e fornecimento do material vegetal necessário para a realização deste projeto;

A todos os professores e funcionários do LTA com os quais tive a oportunidade de conviver e pelo conhecimento que comigo compartilharam. Em especial, agradeço a Ana Lúcia (Aninha), pelos inúmeros cafés da tarde e conversas distraídas;

À amiga Silvia, meu anjo da guarda!! Obrigada por estar sempre ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas

horas que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria. Quero agradecer-te por tudo, porque você fez, faz e fará sempre parte de minha vida!

Às minhas eternas amigas “de bancada” Clara, Lorena e Mariana pelo incentivo, amizade e por sempre ter acreditado e participado de momentos importantes da minha história. Vocês fazem parte desta conquista!

Às amigas da República: Emile e Michele, obrigada pelas diversas situações que passamos juntas;

A Heloisa, Joviane e Kariane pela amizade sincera, pelos conselhos, ensinamentos e companheirismo;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o meu mais profundo agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. REVISO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Cromatografia.....	5
3.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	8
3.1.2 Sistema CLAE.....	12
3.1.2.1. Sistema de Solventes.....	13
3.1.2.2. Fase Estacionária (Coluna Cromatográfica)	14
3.1.2.3. Termostato para Coluna.....	15
3.1.2.4. Sistema de Detecção.....	15
3.2 Validação de Metodologia	16
3.2.1 Linearidade.....	19
3.2.2 Seletividade.....	19

3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)..	20
3.2.4 Precisão.....	21
3.2.5 Exatidão.....	24
3.2.6 Robustez.....	26
3.3 <i>Capsicum baccatum</i> : Uma Visão Geral.....	27
3.4 Composição Química.....	32
3.5 Compostos Fenólicos.....	34
3.5.1 Flavonoides	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Genótipo Utilizado.....	42
4.2 Preparo dos Extratos.....	42
4.3 Quantificação das Substâncias Fenólicas por CLAE.....	43
4.4 Preparo das Amostras	44
4.5 Validação do Método Analítico por CLAE.....	45
4.5.1 Linearidade	45
4.5.2 Seletividade.....	46
4.5.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)..	46
4.5.4 Precisão.....	47
4.5.5 Exatidão.....	47
4.5.6 Robustez.....	48
4.6 Análises Estatísticas.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): Substâncias de referência presentes em <i>C.baccatum</i>	49
5.2 Linearidade.....	54
5.3 Seletividade.....	58
5.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	62
5.5 Precisão.....	64
5.5.1 Repetitividade.....	65
5.5.2 Precisão Intermediária.....	66
5.6 Exatidão.....	70
5.7 Robustez.....	72

6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
APÊNDICE.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amostra sendo eluída através da coluna, chegando ao detector e emitindo o cromatograma.....	7
Figura 2: Histórico do desenvolvimento de partículas para fases estacionárias.....	9
Figura 3: Equipamento de CLAE (I) e Cromatografia em Coluna Aberta (II).....	10
Figura 4: Constituição de um sistema de HPLC.....	13
Figura 5: Fruto de <i>Capsicum baccatum</i> var. pendulum.....	31
Figura 6: Flor de <i>Capsicum baccatum</i> var. pendulum.....	31
Figura 7: Estrutura química do ácido clorogênico.....	31
Figura 8: Estrutura química do flavonoide quercetina.....	32
Figura 9: Estrutura química do flavonoide rutina.....	32
Figura 10: Estrutura química de alguns capsaicinóides que ocorrem em maior quantidade no gênero <i>Capsicum</i>	34
Figura 11: Estrutura química do fenol.....	35
Figura 12: Rota biossintética simplificada dos compostos fenólicos.....	38
Figura 13: Estrutura básica dos flavonoides.....	39
Figura 14: Estrutura das principais classes de flavonoides.....	40
Figura 15: Esquema da obtenção dos extratos etanólicos dos frutos de <i>Capsicum baccatum</i> . CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43

Figura 16: Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, quercetina e rutina.....	50
Figura 17: Cromatograma do padrão de Ácido Clorogênico (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.....	51
Figura 18: Cromatograma do padrão do flavonoide Quercetina (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.....	51
Figura 19: Cromatograma do padrão do flavonoide Rutina (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.....	52
Figura 20: Estrutura química do ácido cinâmico.....	52
Figura 21: Espectro de UV do ácido cinâmico.....	53
Figura 22: Bandas de absorção no UV dos flavonoides.....	53
Figura 23A: Curva analítica do padrão ácido clorogênico.....	56
Figura 23B: Curva analítica do padrão quercetina.....	56
Figura 23C: Curva analítica do padrão rutina.....	57
Figura 24A: Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área do ácido clorogênico (Curva B).....	58
Figura 24B: Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área da quercetina (Curva B).....	59
Figura 24C: Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área da rutina (Curva B).....	59
Figura 25: Cromatograma da Curva A – Soluções de trabalho mistas e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, rutina e quercetina.....	61
Figura 26: Cromatograma da Curva B – 500µl das soluções de trabalho mistas, diluídas com 500 µl da amostra e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, rutina e quercetina.....	61
Figura 27: Estrutura química do 1,8-cineol.....	63
Figura 28: Estrutura química do p- cumárico.....	64
Figura 29: Estrutura química do ácido elágico.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características requeridas para validação pela RE nº 899.	17
Tabela 2. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez de método analítico (BRASIL RE 899, 2003).....	27
Tabela 3. Algumas das espécies de gênero <i>Capsicum</i>	29
Tabela 4. Gradiente de eluição.	44
Tabela 5. Padrões Fenólicos utilizados para quantificação.	45
Tabela 6. Variações nas condições cromatográficas na quantificação das substâncias fenólicas por CLAE.....	48
Tabela 7. Tempos de retenção (T_R), comprimentos de onda (λ máx.) e percentual de área (Área %) dos padrões fenólicos e do acesso 1613 de pimenta, analisados por CLAE.....	50
Tabela 8. Valores referentes à triplicata da curva padrão de ácido clorogênico. ...	55
Tabela 9. Valores referentes à triplicata da curva padrão de quercetina.	55
Tabela 10. Valores referentes à triplicata da curva padrão de rutina.	55
Tabela 11. Avaliação da seletividade de soluções padrões e acesso 1613 de pimenta.	60
Tabela 12. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de ácido clorogênico, quercetina e rutina, empregando CLAE- UV/Vis.	63

Tabela 13. Resultado da repetitividade da solução padrão de ácido clorogênico.	65
Tabela 14. Resultado da repetitividade da solução padrão de quercetina.	66
Tabela 15. Resultado da repetitividade da solução padrão de rutina.	66
Tabela 16. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).	67
Tabela 17. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).	67
Tabela 18. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).	68
Tabela 19. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).	68
Tabela 20. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).	69
Tabela 21. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).	69
Tabela 22. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).	70
Tabela 23. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).	70
Tabela 24. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).	71
Tabela 25. Resultados dos testes de recuperação de substâncias fenólicas em acesso 1613 de pimenta.	72
Tabela 26. Variações nas condições cromatográficas na quantificação de substâncias fenólicas por CLAE.	73

LISTA DE ABREVIações

AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CGAR	Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução
CP	Cromatografia em Papel
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CRM	Materiais de Referência Certificados
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodo
DPR	Desvio Padrão Relativo

EM	Espectrômetro de Massas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
mL	Mililitro
Min	Minutos
μm	Micrômetros
Nm	Nanômetro
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta

RESUMO

MENDES, N.S. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2016. Validação de Método para Determinação de Substâncias Fenólicas em Extrato de *Capsicum baccatum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Professora Orientadora: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc.

A ação antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e terapêutica da espécie *Capsicum baccatum* (Solanacea) conhecida como “dedo-de-moça, chapéu-de-frade ou pimenta vermelha”, está associada a um conjunto de substâncias fenólicas dos extratos provenientes da polpa do fruto, sendo o ácido clorogênico e os flavonoides quercetina e rutina os responsáveis pelas mesmas. O objetivo deste trabalho foi validar um método bioanalítico para quantificação destas substâncias fenólicas presentes no acesso 1613 de *C. baccatum*. O preparo da amostra consistiu na separação manual das sementes e após secos em estufa com circulação de ar a 40°C durante sete dias e triturados, os frutos foram submetidos a refluxo em extrator tipo Soxhlet com etanol 70% (1:10, p/v), por 4h, evaporados em rota evaporador a 79°C. A quantificação das substâncias

fenólicas do extrato etanólico obtido foi realizada por CLAE, empregando-se coluna de fase inversa C-18, eluição com gradiente, fase móvel composta por água tipo MiliQ acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e acetonitrila, fluxo 1mL, detecção a 250 e 350 nm, com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O método foi validado com relação aos seguintes parâmetros estabelecidos: linearidade (ácido clorogênico: 0,993; quercetina: 0,998 e rutina: 0,993), limites de detecção (ácido clorogênico: 0,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$; quercetina: 3,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e rutina: 1,79 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e de quantificação (ácido clorogênico: 2,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$; quercetina: 5,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e rutina: 11,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos no estudo de seletividade do método no extrato de *C. baccatum* indicaram ser seletivo apenas para o ácido clorogênico. No entanto, observou-se a identificação dos flavonoides quercetina e rutina nas análises espectrais. Os valores de desvio padrão relativo, obtidos para precisão, nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, não excederam o máximo de 15% estipulado nos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos. A exatidão foi realizada em termos de recuperação, para as substâncias fenólicas de interesse na faixa de 75 a 93%. A robustez do método foi avaliada por variação na velocidade de fluxo e temperatura do forno. Verificou-se interferência significativa nos resultados do ácido clorogênico e quercetina. Contudo, a rutina, nas condições usuais descritas, não causou interferência significativa nos resultados. Sendo assim, o método validado, utilizando padronização externa, foi aplicado para quantificação das substâncias fenólicas, no acesso 1613 de pimenta. Estes resultados demonstram a importância do emprego de metodologias bioanalíticas, além do controle de qualidade das matérias-primas vegetais e, possivelmente, aplicações na indústria de alimentos como um antioxidante natural, contribuindo com a segurança alimentar e qualidade nutricional de produtos alimentícios.

ABSTRACT

| MENDES, N.S. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March. 2016. Validation Method for Determination of Phenolic Substances in Extract *Capsicum baccatum* Chromatography Liquid High Efficiency (CLAE). Professor Advisor: Daniela Barros de Oliveira, D.Sc. Committee Members: Geraldo de Amaral Gravina. D.Sc.; Luana Pereria de Moraes, D.Sc.; Renata Gomes de Brito Mariano, D.Sc.

The action antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and therapeutical of the species *Capsicum baccatum* (Solanacea) known as "dedo-de-moça, chapéu-de-frade or red pepper," is associated with a set of phenolic substances of the extracts from the fruit seed, and chlorogenic acid and flavonoids quercetin and rutin those responsible for them. The objective of this study was to validate a method bioanalytical for quantification of these phenolic substances in access 1613 *C. baccatum*. The sample preparation consisted of manual separation of seeds and after dried in the oven with air circulation at 40 ° C for seven days and crushed the fruits were refluxed in extractor Soxhlet type with 70% ethanol (1:10, p

/ v) for 4h, evaporated in the evaporator route to 79° C. The quantification of the phenolic compounds obtained ethanolic extract and was performed by CLAE, using reverse phase C-18 column, gradient elution, mobile phase composed of water MilliQ type acidified with phosphoric acid (pH 3.2) and acetonitrile, flow 1mL, detection at 250 and 350 nm with a diode array detector (CLAE-DAD). The method was validated with respect to the following parameters determined: linearity (chlorogenic acid: 0.993; quercetin: 0.998 and rutin: 0.993), detection limits (chlorogenic acid: 0.81 ug mL⁻¹; quercetin: 3.78 ug mL⁻¹ and rutin: 1.79 ug mL⁻¹) and quantification (chlorogenic acid: 2.45 ug mL⁻¹; quercetin: 5.45 ug mL⁻¹ and rutin: 11.47 ug mL⁻¹). The results obtained in the study of the selectivity of the method of *C. baccatum* extract indicated to be selective only chlorogenic acid. However, was observed the quantification of quercetin and rutin in the spectral analyzes. The relative standard deviation values, obtained for both accuracy levels of repeatability and intermediate precision, did not exceed the maximum of 15% stipulated in the acceptance criteria for bioanalytical methods. The accuracy was performed in terms of recovery, for phenolic substances of interest in the range of 75 to 93%. The robustness of the method was assessed by varying the flow rate and oven temperature. There was a significant interference in the results of chlorogenic acid and quercetin. However, rutin, under the usual conditions described did not cause significant interference in the results. Therefore, the validated method utilizing external standardization was applied for quantitation of phenolic compounds in the 1613 pepper. These results demonstrate the importance of the use of bioanalytical methods, in addition to the quality control of plant raw materials and possibly applications in the food industry as a natural antioxidant, contributing to food security and nutritional quality of food products.

1. INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que os condimentos, presentes em pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum*, apresentam expressivas concentrações de substâncias relevantes para a saúde (Bosland e Votava, 2000) tais como: compostos bioativos com propriedades antioxidantes. As substâncias fenólicas fazem parte deste grupo de compostos bioativos e auxiliam na prevenção do envelhecimento, doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Moraes et al., 2012).

Capsicum baccatum var. *pendulum* conhecida popularmente como dedo-de-moça, chapéu-de-frade ou pimenta vermelha, é uma das espécies do gênero *Capsicum* amplamente consumidas no país, representando o terceiro lugar em produção e consumo de hortaliças usadas para tempero no Brasil, perdendo apenas para o mercado de alho e de cebola. É difundida em praticamente todas as regiões brasileiras, principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará, Rio Grande do Sul, Bahia e Sergipe (Ribeiro et al., 2008).

Neste contexto, pesquisas em busca de compostos naturalmente presentes em pimentas, tais como as substâncias fenólicas, vêm crescendo nos últimos anos e recebendo maior atenção da comunidade científica, visto que estes compostos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas (Zhong e Shahidi, 2012).

De acordo com Costa (2005), uma das técnicas mais utilizadas para a identificação e quantificação destes metabólitos é a Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE). Esta técnica consiste na separação cromatográfica baseada nas interações entre soluto e fase estacionária, devido às características físico-químicas de cada substância. A obtenção de uma separação mais adequada depende da polaridade, do caráter iônico e da massa molecular da substância, do tipo de interação desta com as fases móvel e estacionária (Cass e Degani, 2001).

A CLAE tem se firmado nas últimas décadas como uma técnica que permite realizar separações e quantificar moléculas presentes em vários tipos de amostras com alta eficiência, resolução e detectabilidade (Collins, 2006).

Paralelamente, observa-se a necessidade de uma validação de métodos para a detecção das substâncias fenólicas. King (2003) relata que muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando validação de métodos, o que representa uma etapa importante para os laboratórios de tecnologia de alimentos e, conseqüentemente, menos um obstáculo para a credibilidade dos resultados emitidos (Pereira et al., 2007). Segundo o mesmo autor, seus estudos vêm demonstrando que todo método, antes da sua utilização, deve ser validado no laboratório em que será aplicado, a fim de assegurar as condições mínimas de sua execução com a confiabilidade requerida.

Dessa forma, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas (Ribani et al., 2004). É importante mencionar que a validação deve apresentar a especificidade, seletividade, linearidade, exatidão e precisão adequadas à análise. Ter um resultado obtido por um método validado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento a toda a sequência analítica, seja aceito como correto (Silva e Alves, 2006).

A pesquisa conduzida neste trabalho é parte de um projeto anterior, denominado “Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*” (Assis, 2014), realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), no setor de Química de Alimentos, em parceria com a Prof.^a Dr.^a Rosana Rodrigues do Programa de Melhoramento da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes - RJ. Nos dados verificados por CLAE (Assis, 2014), foi demonstrado que o acesso 1613 se destacou dos demais acessos por apresentar melhor atividade antioxidante e como fonte de compostos fenólicos.

Desta forma, o enfoque deste trabalho foi validar um método para a análise das substâncias fenólicas (ácido clorogênico, flavonoides quercetina e rutina), presentes na espécie *Capsicum baccatum* (acesso 1613), utilizando a CLAE como ferramenta analítica visando garantir a confiabilidade do método e de seus resultados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar um método para determinação de substâncias fenólicas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em extratos de *Capsicum baccatum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar o extrato etanólico da polpa dos frutos de *C. baccatum*: acesso 1613;
- Obter o perfil químico deste extrato por CLAE;
- Identificar e quantificar nas amostras as substâncias fenólicas: ácido clorogênico, flavonoides quercetina e rutina;
- Validar o método analítico desenvolvido por CLAE segundo os parâmetros de linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cromatografia

O termo cromatografia se origina dos radicais gregos *chroma*, significa cor, e *grafie*, significa escrita (Lázaro De La Torre, 2013 apud Collins, 1997). A sua primeira aplicação data de 1903 e foi atribuída ao estudo de Michael S. Tswett, que pesquisou a separação dos componentes de extratos de folhas, utilizando uma coluna de vidro com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter dietílico como fase móvel. Como a separação dos extratos resultou em componentes coloridos, foi dado o nome ao método, em 1906, de cromatografia, apesar de a separação dos extratos não ter sido dependente de cor (Collins, 2006).

A Cromatografia é um método físico-químico de separação, identificação e quantificação dos componentes de uma mistura. Esta separação ocorre pela migração diferencial dos componentes da mistura, devido às interações com as fases móvel e estacionária (Wang e Turnispeed, 2012).

O princípio da separação cromatográfica se dá por meio de uma fase estacionária, em que a amostra é carregada por intermédio de um fluido denominado fase móvel (Skoog et al., 2002; Simpson, 1978).

Segundo Collins e Braga (1987), as diferentes formas de Cromatografia podem ser classificadas em:

1) Cromatografia em coluna: a) Cromatografia Líquida Clássica (CLC) para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas, a quantificação é feita por análise manual; b) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência, pode ser usada para absorção de *ultravioleta* (UV), fluorescência, espectrometria de massas e amperométrica, geralmente tem alto custo de operação e não é muito utilizada para realizar análises qualitativas; c) Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução (CGAR) para identificação imediata de substâncias presentes na amostra.

2) Cromatografia planar: a) Cromatografia em Papel (CP) é uma técnica de partição líquido-líquido útil para a separação de compostos polares; b) Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica de absorção líquido-sólido que também permite a separação de compostos e utiliza misturas de solventes na fase móvel onde a quantificação pode usar luz ultravioleta (UV) e desintometria; c) Cromatografia por Centrifugação (Chromatotron) para acelerar o processo pode também ser usado um dispositivo em que através da aplicação de uma alta velocidade circular à fase estacionária, a fase móvel e a amostra evoluem radialmente por inércia. Esta última é utilizada só com fins preparativos.

3) Ensaio Imunoenzimático (ELIZA): o método utilizado para realizar o teste se baseia na interação anticorpo-antígeno. Normalmente, é usada uma placa de superfície inerte com poços onde serão adsorvidos os antígenos de interesse juntamente com um tampão de carbonato (processo conhecido como sensibilização). Sua desvantagem é que produz falso-positivo (Amaral e Machinski, 2006).

De maneira geral, a cromatografia destaca-se por ser uma das técnicas mais empregadas em diversas indústrias como alimentícias, farmacêuticas, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, etc., onde frequentemente é necessário purificar, isolar ou quantificar substâncias de misturas muito complexas. Sendo esta a técnica mais apropriada para uma separação mais eficiente de extratos brutos como também para controlar a pureza final de compostos isolados (CRQ, 2010).

Sabe-se que a identificação de compostos é realizada através da cromatografia, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a

separação dos componentes de uma mistura por interação dos seus componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel (Carlos et al., 2011).

Ainda com relação à cromatografia, é importante salientar que após a amostra ser introduzida no sistema cromatográfico, seus componentes se distribuem entre as duas fases e de acordo com a interação entre estes componentes dá-se a separação dos constituintes analisados e o detector registra o resultado na forma de um cromatograma (Simpson, 1978). Desta forma, o cromatograma (Figura 1) é a resposta do detector na forma de gráfico, representando assim, a concentração do analito em função do tempo ou do volume de eluição (Gomes, 2010).

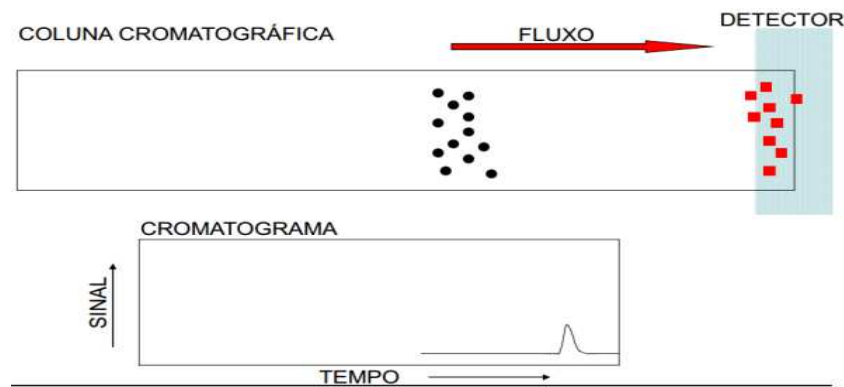


Figura 1. Amostra sendo eluída através da coluna, chegando ao detector e emitindo o cromatograma.

Fonte: < http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf>. Acessado em 20 de novembro de 2015.

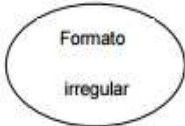









Ressalta-se que vários parâmetros de um cromatograma caracterizam o processo de separação das substâncias de uma mistura. Dentre estes parâmetros pode-se citar (Gomes, 2010):

- t_0 (tempo morto da coluna): é o tempo em que um soluto que não foi retido na coluna demora para ser eluído, ou seja, é quanto demora para sair um soluto que não possui afinidade pela coluna;
- t_R (tempo de retenção): é o quanto demora um soluto a ser totalmente eluído da coluna;

- $w_{1/2}$: largura do pico a meia altura;
- w (largura do pico): resultante da interseção das duas tangentes aos pontos de inflexão do pico;
- $k = (t_R - t_0) / t_0 = (t'_R / t_0)$ (fator de retenção): é um parâmetro termodinâmico que fornece uma medida relativa do tempo em que o analito permanece na fase estacionária e na fase móvel.

3.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Desde o início do desenvolvimento da Cromatografia Líquida, na década de 50, até os dias atuais, muitos avanços foram alcançados, impulsionados pelo desenvolvimento de novas partículas de fases estacionárias e da instrumentação. A necessidade de execução de análises mais rápidas, sem que houvesse o comprometimento do desempenho cromatográfico, foi o que impulsionou as pesquisas com o objetivo de tornar a técnica mais rápida e eficiente (Wren e Tchelitcheff, 2006). Um resumo do histórico do desenvolvimento de partículas para fases estacionárias da CLAE pode ser observado na Figura 2.

Ano de introdução	Tamanho da partícula	Tamanho nominal mais popular (μm)	Pratos/15 cm (Aproximado)
1950	 Formato irregular	100	200
1967	 Pérola de vidro	50 pelicular	1000
1972		10	6000
1985		5	12000
1992		3-3,5	22000
1996		1,5* pelicular	30000
1999		5,0 superfície porosa	8000**
2000		2,5	25000
2003		1,8	32500
2006		2,7	-

*Silica não porosa ou resina ** Para proteína PM 5.700

Figura 2. Histórico do desenvolvimento de partículas para fases estacionárias.
Fonte: Guiochon e Gritti (2011) e Majors (2005).

A primeira análise em um cromatógrafo líquido automático com gradiente de eluição foi descrita por Moore e colaboradores em 1958. Mas, foi somente a partir dos anos 70 que se conseguiu um avanço considerável nas técnicas cromatográficas, conseguindo-se o nível de sofisticação que a CLAE apresenta, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia (Skoog et al., 2002; Spackman et al., 1958).

O avanço foi mais significativo quando se tornou possível a construção de colunas recheadas com partículas cada vez menores, necessárias para uma alta resolução e tornou-se também possível se adquirir equipamentos capazes de trabalhar a altas pressões, necessárias para se obter uma boa velocidade de eluição (Skoog et al., 2002).

De acordo com o tipo do recheio da coluna, pode-se dizer que a CLAE pode ser dividida em dois grupos: em fase normal e em fase inversa. Na cromatografia em fase normal tem-se uma fase estacionária polar (normalmente

sílica) e conseqüentemente uma fase móvel apolar. Nas separações em fase inversa tem-se uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, este sistema se baseia em forças atrativas entre solutos não polares e grupos funcionais não polares ligados a um suporte de sílica (Gomes, 2010).

Neste sentido, as substâncias com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente, já as substâncias com pouca afinidade com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Portanto, pode-se dizer que, nas cromatografias em fase inversa, os compostos apolares permanecem mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel (CRQ, 2010; Gomes, 2010).

De maneira geral, o desenvolvimento da CLAE, simplificou e agilizou as análises, proporcionou maior reprodutibilidade dos resultados e maior exatidão quantitativa, pois no processo clássico, a análise é realizada em colunas abertas, empacotadas manualmente, com o solvente sendo bombeado lentamente, através da coluna, sendo que na maioria das vezes a caracterização e a quantificação dos analitos eram realizadas manualmente utilizando-se um espectrofotômetro, colorímetro, etc. A Figura 3 mostra um equipamento de CLAE e a estrutura para realizar a cromatografia líquida convencional em coluna aberta (Aquino Neto e Souza Nunes, 2003).

I



II



Figura 3. Equipamento de CLAE (I) e Cromatografia em Coluna Aberta (II).

Com a CLAE todo o processo foi automatizado, e o que antes levava dias, pôde começar a ser feito em apenas algumas horas, isso levou a uma grande economia de tempo, de mão de obra e de materiais, principalmente solventes (Aquino Neto e Souza Nunes, 2003). Porém, é importante mencionar que a

seleção de solventes adequados depende dos compostos a serem analisados e das técnicas de ionização e colunas que serão utilizadas, sendo a composição da fase móvel crítica para a eficiência da análise (Wang e Turnipseed, 2012).

Para Guillaume e Veuthey (2013), a CLAE se tornou nos últimos anos a técnica mais importante de separação em diversas áreas, principalmente, na análise de alimentos.

Além disto, esta técnica ainda pode estar acoplada a uma série de detectores, fornecendo uma maior eficiência na separação, bem como informações valiosas sobre a fórmula estrutural dos compostos, contemplando sua eficácia na identificação de compostos. Dentre estas formas de acoplamento, destaca-se o acoplamento ao Espectrômetro de Massas (LC/EM) e ao Ultravioleta (LC/UV), que são técnicas que fornecem informações muito mais valiosas e em curto espaço de tempo, permitindo uma completa caracterização espectroscópica de diferentes metabólicos de uma mistura complexa em uma única análise (Assis, 2014).

Há registros de que a CLAE foi utilizada pela primeira vez para a determinação de flavonoides em 1976 por Fischer e Wheaton. Posteriormente, diversas outras técnicas foram propostas para a separação e determinação de flavonoides e compostos fenólicos em geral (Bruggink, 2000).

Kappel et al. (2008) verificaram, por meio desta técnica, a presença de compostos fenólicos como a rutina, o ácido caféico e o clorogênico em extratos aquosos de pimenta (*Capsicum baccatum*).

Utilizando o mesmo procedimento, Zimmer et al. (2012), em um estudo a partir da mesma espécie não detectaram a presença de capsaicina. É importante salientar que a variedade, o grau de maturação da planta, bem como sua origem geográfica e os tipos de métodos analíticos de extração utilizados interferem na síntese de seus metabólitos.

Nessa perspectiva, os flavonoides são o grupo de compostos fenólicos mais encontrados em plantas e são consideravelmente citados na literatura, devido aos benefícios proporcionados à saúde humana, destacando-se entre suas ações biológicas, sua capacidade antioxidante (Lisa et al., 2010; Plochmann et al., 2007; Boue et al., 2003).

As análises que envolvem este tipo de molécula são realizadas normalmente em colunas de fase inversa C-18, e as diferenças nas

características dos métodos de identificação e quantificação estão associadas com o sistema de detecção e eluição (Gomes, 2010).

A eluição com gradiente é normalmente usada em virtude da complexidade do perfil fenólico das amostras de pimentas. Numerosas fases móveis têm sido empregadas, mas um sistema binário compreendendo um componente aquoso e um solvente orgânico menos polar (exemplo acetonitrila ou metanol) tem sido o mais comum. Ácidos (fórmico, acético ou fosfórico) têm sido adicionados à fase aquosa para manter o pH apropriado durante a execução do gradiente (Socha, et al., 2009; Tsiapara et al., 2009; Tomásbarberán, 1993).

Em CLAE a detecção de substâncias fenólicas é tipicamente baseada na medida de absorção por ultravioleta, frequentemente usando um detector de arranjo de fotodiodo (DAD). A combinação de ambos o espectro de UV-Vis e o tempo de retenção (Tr) pode conduzir mais facilmente a identificação das substâncias separadas. O DAD pode simultaneamente detectar substâncias em diferentes comprimentos de onda. Este fato aumenta significativamente a eficiência do sistema de separação, particularmente quando diferentes grupos polifenólicos estão misturados em uma mesma amostra. Quando é escolhido o comprimento de onda correto (no máximo de absorção) todos os grupos podem ser detectados com mais alta sensibilidade. Uma seleção apropriada do comprimento de onda pode também possibilitar a quantificação de um pico com pouca resolução. Contudo, uma abordagem convencional baseada no espectro de UV é frequentemente limitada quando amostras contêm substâncias muito semelhantes (Socha et al., 2009; Tsiapara et al., 2009; Tomásbarberán, 1993).

3.1.2 Sistema CLAE

A CLAE (Figura 4) é uma técnica de separação automatizada, constituída por um conjunto de equipamentos especiais:

1. reservatório contendo fase móvel;
2. sistema de bombeamento de alta pressão (bombas);
3. injetor de amostras;
4. sistema analítico – coluna cromatográfica e forno;
5. sistema de detecção;
6. sistema de registro e análise dos dados (Gonçalves, 2005).



Figura 4. Constituição de um sistema de HPLC.

O conhecimento sobre todos os componentes que constituem um cromatógrafo é de grande relevância, pois permite a identificação e a quantificação dos compostos presentes na amostra, com um tempo e custo reduzidos (Jickells e Negrusz, 2008). Entretanto, para execução de análises mais eficientes e rápidas faz-se necessário um detalhamento sobre os diferentes sistemas de solventes, tipos de fases estacionárias utilizadas, termostato para coluna e do sistema de detecção.

3.1.2.1. Sistema de Solventes

Segundo Gonçalves (2005), o sucesso da separação de misturas, utilizando a Cromatografia Líquida, depende de uma escolha adequada da fase móvel acoplada a uma fase estacionária conveniente. A separação dos compostos de interesse pode acontecer pelo emprego de um único solvente de composição constante chamado de eluição isocrática, ou pelo emprego de dois ou três sistemas de solventes, que diferem bastante entre si em polaridade, pela eluição com gradiente. Há uma grande variedade de solventes utilizados, no entanto, existem algumas propriedades desejáveis para seu uso em CLAE:

- Alta pureza;
- Não decomposição do analito e da fase estacionária;
- Compatibilidade com o sistema de detecção;
- Baixa viscosidade;
- Dissolução da amostra;

- Baixo custo.

3.1.2.2. Fase Estacionária (Coluna Cromatográfica)

A coluna cromatográfica determina a seletividade e eficiência da separação. Essa capacidade é definida através da seleção de características ideais da coluna, tais como o empacotamento (fase estacionária) e sua porosidade, dimensões da coluna, diâmetro das partículas empregadas, a fim de obter condições ótimas na separação por cromatografia líquida. A coluna de sílica é bastante utilizada em cromatografia líquida, sendo certamente, a fase estacionária mais comum nos processos de separação cromatográfica (Porto, 2014).

A separação dos compostos empregando cromatografia líquida deve-se principalmente aos fenômenos que ocorrem na interface fase estacionária/ fase móvel e, a interação entre os componentes das amostras e essa interface envolve vários processos físico-químicos que refletem na atração ou repulsão relativa destes. Esses fenômenos, em geral, são forças intermoleculares fracas do tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, transferências de cargas, interações iônicas, além de processos de adsorção, partição, exclusão por tamanho molecular, contracorrente, complexação e outros (Nascimento, 2004; Ciola, 1998).

Há dois principais mecanismos envolvidos no retardamento da passagem de um composto pela coluna. Em colunas de fase inversa, a fase estacionária é menos polar que o solvente (fase móvel). Desta maneira, pode-se dizer que, na cromatografia de fase inversa os compostos apolares, ou fracamente polares, são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção na fase estacionária é tanto maior, quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel. Na cromatografia líquida de fase inversa utilizam-se, como adsorventes da fase estacionária, substâncias quimicamente modificadas com ligações de grupos funcionais (Lewandrowski, 2002).

Por outro lado, quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, designou-se que a cromatografia líquida é de fase normal. Desta forma, em uma solução contendo compostos mais polares que outros, os compostos mais polares vão ter uma maior afinidade com a fase estacionária, saindo da coluna de separação mais tarde do que os compostos menos polares. Na cromatografia

líquida de fase normal, os adsorventes da fase estacionária mais utilizados são normalmente a sílica e a alumina (Porto, 2014).

O conhecimento das forças envolvidas no processo de separação é fundamental para entender o processo cromatográfico e desta forma propor condições ideais, determinando o comportamento do sistema e elegendo a combinação entre as fases estacionária e móvel para obter resultados desejáveis (Gonçalves, 2005).

3.1.2.3. Termostato para Coluna

Os termostatos ou fornos de coluna são uma das partes mais simples de um cromatógrafo líquido. Constituem apenas uma câmara com isolamento térmico e uma resistência para aquecimento. Apesar de sua simplicidade são extremamente importantes, pois a temperatura de separação é um dos fatores que afetam a eficiência da separação cromatográfica, sendo desejável que essa temperatura possa ser controlada pelo operador e esteja livre de influências da variação da temperatura ambiente (Schulz, 2014).

3.1.2.4. Sistema de Detecção

O detector mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna do sistema cromatográfico. A interpretação dos dados registrados pelo detector produz informações quantitativas e qualitativas sobre a amostra e seus constituintes. A escolha de um detector depende da sua sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão adequadas para a execução e o tempo da análise empregada (Gonçalves, 2005).

Existem diversos tipos de detectores: detectores espectrofotométricos (UV), de fluorescência (sensíveis a espécies que fluorescem), de índice de refração, eletroquímicos, de massa, de dispersão de luz, de radioatividade e detectores especiais (Collins e Guimarães, 1988).

De acordo com Skoog et al. (2002), um detector de CLAE deve seguir alguns requisitos, dentre os quais se destacam:

- Boa sensibilidade para todos os solutos;
- Limite de detecção suficientemente baixo;

- Boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal;
- Resposta rápida do sensor;
- Detector com menor volume possível.

Além disso, o detector deve possuir algumas características adicionais às referidas anteriormente, que vão afetar a aplicação do mesmo. Sendo assim, o sinal do detector deve ser o menos possível influenciado pela temperatura, pela velocidade do fluxo e pela composição da fase móvel, para que seja garantida uma correta detecção dos analitos. Desta forma, o detector deve ser adequado aos componentes que se pretendem analisar e que percorrem a coluna cromatográfica, para que a eficácia da detecção e quantificação dos mesmos seja elevada (Collins e Guimarães, 1988).

Portanto, devido a estas inúmeras potencialidades a CLAE, tem sido nos últimos anos a técnica mais empregada na análise de substâncias fenólicas, principalmente os flavonoides e suas demais subclasses (Dutra e Ribani, 2010).

Sendo assim, a validação de um método para a análise das substâncias fenólicas presentes, em especial na espécie de *Capsicum baccatum*, é de extrema importância para garantir a confiabilidade do método e de seus resultados.

3.2. Validação de Metodologia

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação (Ribani et al., 2004). Validar significa provar e documentar resultados que indiquem que o método é seguro dentro dos limites estabelecidos, e que com sua aplicação se conseguem os resultados desejados (Gil, 2010).

A legislação em vigor no Brasil é a resolução da ANVISA RE nº899, de 29 de maio de 2003, segundo a qual a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Lowen, 2003).

De acordo com a Tabela 1, os testes utilizados para validação analítica são divididos em 4 categorias, diferindo entre si por finalidade a que se destina: categoria I, testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos

farmacêuticos ou matérias-primas; categoria II, testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas; categoria III, teste de performance (dissolução, liberação do ativo, dentre outros); categoria IV, teste de identificação (Anvisa, 2003). No presente trabalho utilizará a categoria I que se refere à matéria-prima por ser um extrato vegetal.

Segundo Paula (2004), muito se tem falado sobre validação, certificação e qualificação de instalação, equipamento, processo e metodologia analítica, porém a falta de definições padronizadas de linguagem do setor cria uma barreira para o entendimento total dos termos.

A busca da qualidade total requer um domínio amplo de cada fase do processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação deste processo, bem como de componentes-chave que incluam qualificação de equipamentos, instalação, fornecedores e a validação de metodologias analíticas (Gil, 2010).

Tabela 1. Características requeridas para validação pela RE nº 899.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II Quantitativo	Categoria II Ensaio limite	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Se houver comprovação da reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Portanto, a validação da metodologia analítica constitui-se na atividade essencial e inicial de um programa de garantia de qualidade bem estruturado (Gil, 2010). Nesse sentido, a validação de uma metodologia é necessária para garantir que o método é apropriado à finalidade pretendida, ou seja, a determinação de modo qualitativo, semiquantitativo e quantitativo (Stenger, 2011).

A validação se aplica a técnicas que utilizem Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução (CG) e CLAE e também a métodos não cromatográficos, como titulometria, espectrofotometria UV visível e ainda para testes imunológicos e microbiológicos (Anvisa, 2003).

A validação de um método que utiliza técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos a fim de avaliar as características do método. Logo, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação das variáveis (Lanças, 2004).

Além disso, os estudos de validação envolvem a avaliação de características de desempenho do método, em condições experimentais definidas de forma a garantir a sua aplicabilidade ao nível do intervalo de concentrações e tipos de amostras. Especialmente, no caso de fitoterápicos e extratos vegetais, a validação deve seguir a metodologia analítica, no entanto, os resultados podem seguir os critérios de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade do extrato vegetal, permitindo limites de aceitação maiores em relação aos métodos analíticos (Anvisa, 2013; Klein, et al., 2009).

Entende-se como método bioanalítico aquele que utiliza matriz biológica. A importância de garantir o resultado confiável para um método bioanalítico através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. As variáveis analíticas normalmente utilizadas para validação são: linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (Ribani et al., 2004).

3.2.1 Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada, dentro de uma faixa de aplicação (Swartz e Krull, 1998; ICH, 1995).

Recomenda-se que o teste seja realizado com, no mínimo, 5 concentrações diferentes do analito (ICH, 2005; Anvisa, 2003). Pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, através da relação entre o sinal medido (área do pico) e a concentração da substância fenólica de interesse a ser quantificada (Barros et al., 2002). A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Custodio et al., 1997). Sendo também possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r^2) (Chui et al., 2001). Como critério de aceitação a Anvisa (2013) estipula um coeficiente de correlação igual a 0,98.

3.2.2 Seletividade

É a capacidade que o método possui de avaliar a substância na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Anvisa, 2003; Inmetro, 2003), garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (Vessman et al., 2001). Logo, se a seletividade não for assegurada, tais parâmetros como a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidos.

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. Uma forma de avaliar a seletividade em um método analítico por CLAE é o método de adição padrão, pois não é possível obter a matriz isenta do analito. Neste caso, é feita duas curvas analíticas, uma com adição da substância de interesse na amostra e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferências de outros componentes da matriz na determinação da substância de interesse, portanto, o método é seletivo (Inmetro, 2003).

Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (Vessman et al., 2001; Huber, 1998; Jenke, 1998).

Outro procedimento para avaliar a seletividade é através da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse como, por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos (Jenke, 1998).

3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os termos limite de quantificação e limite de detecção são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito (Cassiano et al., 2009; Friedrich et al., 2009).

O limite de detecção (LD), é a concentração mínima da substância a analisar que pode ser detectada pelo método com precisão e exatidão adequadas e pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani et al., 2004).

Para métodos instrumentais como CLAE, CG, o limite de detecção pode ser estimado pela concentração correspondente a um pico três vezes maior que o ruído na linha de base. Outro modo seria utilizando a equação 1 (Anvisa, 2003):

$$LD: (DPa \times 3) / IC$$

Equação 1

Onde:

LD: limite de detecção;

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo y ou coeficiente linear, de no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância de interesse próximas ao limite de quantificação ou pode ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;

IC: inclinação da curva de calibração ou coeficiente angular.

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a menor concentração da substância a analisar que pode ser quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão (Emer e Miller, 2005; Ribani et al., 2004). Assim como o LD, é utilizada uma solução com concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão que produzam um pico dez vezes maior que o ruído de linha base ou pode ser calculado pela equação 2 (Anvisa, 2003):

$$\text{LQ: } (DP \text{ a } \times 10) / \text{IC}$$

Equação 2

Onde: LQ: limite de quantificação.

É importante mencionar que tanto o LD e o LQ são influenciados diretamente pelas condições cromatográficas, devendo então ser asseguradas, através da conformidade do sistema, as melhores condições cromatográficas possíveis e também qualidade e tempo de uso da coluna cromatográfica (Lanças, 2004; Ribani et al., 2004).

3.2.4 Precisão

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios (Cassiano, et al., 2009; Anvisa, 2003) e representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (Inmetro, 2003; ICH, 1995). Em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

\bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de m , a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores na qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, calculada pela equação:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

em que: t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student com $n-1$ graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macroquantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Huber, 1998).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermediária; reprodutibilidade.

Repetibilidade (Precisão Intradia)

Define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório e utilizando os mesmos reagentes (Cassiano, et al., 2009; Anvisa, 2003).

É importante mencionar que o termo repetibilidade é adotado pela ANVISA. Por outro lado, o Inmetro utiliza o mesmo conceito para o termo de repetitividade (Anvisa, 2003).

Ainda segundo a Anvisa (2003) e ICH (1995) sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado. Já o Inmetro (2003) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão.

A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio (Shabir, 2003; Green, 1996) ou intracorrída (Anvisa, 2003) e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR).

Precisão Intermediária (Interdias)

Define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (Cassiano et al., 2009; Friedrich, et al., 2009).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR).

Reprodutibilidade

De acordo com o Inmetro (2000), a reprodutibilidade representa o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias, procedimentos do CODEX, etc.

É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos colaborativos. Frequentemente, altas variações são observadas entre os

resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método. Estudos colaborativos não são somente indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, eles também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão do método (Vial e Jardy, 2001).

A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual (Thompson, et al., 2002). Além disso, mais crítico que o número de laboratórios envolvidos é que estes possuam competência e habilidades similares àqueles que usarão o método em rotina.

3.2.5 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência. Assim, uma variação expressa como 105% indicaria uma tendência positiva de desvio de 5%, enquanto uma exatidão expressa como 95% significaria uma tendência negativa de 5%. É importante mencionar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (Lanças, 2004).

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1995) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela Anvisa (2003).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificada; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição de padrão (Emer e Miller, 2005; Ribani et al., 2004).

Materiais de Referência Certificados (CRM)

Os CRM são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material

de referência, para verificar a exatidão do método. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST ("National Institute of Standards and Technology" - USA), LGC ("Laboratory of the Government Chemist" - UK), USP, FAPAS ("Food Analysis Performance Assessment Scheme" - UK), entre outros (Ribani et al., 2004).

Comparação de Métodos

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida. As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos em separado (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras, em uma faixa de concentrações em que se pretende validar o método (Ribani et al., 2004).

Ensaio de Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e possível de ser quantificada (Thompson et al., 1999).

As medições de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade em se obter CRM (que, para certas aplicações, nem existem) e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo), em um determinado número de ensaios (Burns et al., 2002).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de

interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (Garp, 1999).

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados (Ribani et al., 2004).

Adição Padrão

No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis em uma matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância (Andrade, 1987). Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz (Snyder et al., 1997).

A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. Um exemplo seria a análise de b-caroteno em amostras de mamão, nas quais o b-caroteno sempre estará presente (Ribani et al., 2004).

3.2.6 Robustez

De acordo com o Inmetro (2003), a robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Considera-se que um método é robusto

quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros.

Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (Ribani et al., 2004).

Na tabela abaixo estão descritos os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 2. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez de método analítico (BRASIL RE 899, 2003).

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução Temperatura Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel Variação na composição da fase móvel Diferentes lotes ou fabricantes de coluna Temperatura Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de coluna Temperatura Velocidade do gás de arraste

Logo, constata-se a importância da CLAE, principalmente no que tange controle de qualidade e validação de métodos para análise de extratos vegetais, pois proporciona separação prévia e permite identificar e quantificar as substâncias (Nascimento et al., 2008). Entretanto, a identificação e quantificação de uma substância por um método analítico só se torna confiável quando advinda de uma metodologia validada, o que garante comparabilidade e rastreabilidade (Ribani et al., 2004).

3.3 *Capsicum baccatum*: Uma Visão Geral

Plantas condimentares, tais como as pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, da qual também fazem parte os pimentões, o tomate, a batata, a berinjela e o jiló (Castro et al., 2011).

Divisão: Spermatophyta,

Filo: Angiospermae,

Classe: Dicotiledônea,

Ramo: Malvales-Tubiflorae,

Ordem: Solanales (Personatae),

Família: Solanaceae,

Gênero: *Capsicum* (Wagner, 2003).

As pimentas do gênero *Capsicum* estão entre os vegetais e especiarias mais antigos do mundo (Guzman et al., 2010). Em função dos excelentes atributos nutricionais e sensoriais, e a promoção de benefícios à saúde, estes vegetais são uns dos mais consumidos mundialmente (Di Cagno et al., 2009).

É importante mencionar que as pimentas deste gênero são o segundo tempero mais comercializado no mundo, perdendo apenas para as pimentas do gênero *Piper*, conhecidas como pimentas do reino (Bosland e Votava, 2012).

O gênero *Capsicum* caracteriza-se por apresentar uma grande variação morfológica, com frutos de tamanhos, formatos, cores e grau de pungência (ardência, característica conferida pela presença de capsaicinoides) variados (Carvalho e Biachetti, 2004).

Ainda segundo Carvalho e Biachetti (2004), a coloração do fruto maduro é geralmente vermelha, podendo variar desde amarelo-leitoso ao roxo, ou preto. O formato varia de acordo com as espécies, existindo frutos alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, quadrados e campanulados. Por observação de determinadas características e usos, são separados e classificados popularmente como pimentas e pimentões. Assim, os pimentões apresentam frutos grandes e largos, formato quadrado a cônico, paladar não pungente (doce), enquanto as pimentas apresentam, em sua maioria, frutos menores que os pimentões, formatos variados e paladar predominantemente pungente.

Wahyni et al. (2013) relatam que a pimenta *Capsicum* compreende cerca de 30 espécies diferentes, das quais apenas cinco são comumente cultivadas e utilizadas pelo homem: *Capsicum annum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., e *Capsicum pubescens* (Tabela 3). O centro de origem das pimentas do gênero *Capsicum* é o continente americano, porém elas se desenvolvem em regiões tropicais e temperadas por todo o mundo (Bae et al., 2012).

Apesar de serem nativas da América, os maiores consumidores e produtores das pimentas *Capsicum* são a China, Índia e México (Bosland e Votava, 2012).

Tabela 3. Algumas das espécies de gênero *Capsicum*.

<i>Capsicum annum</i>	<i>Capsicum cornutum</i>	<i>Capsicum leptopodium</i>
<i>Capsicum baccatum</i>	<i>Capsicum dimorphum</i>	<i>Capsicum lycianthoides</i>
<i>Capsicum abbreviatum</i>	<i>Capsicum dusenii</i>	<i>Capsicum luteum</i>
<i>Capsicum breviflorum</i>	<i>Capsicum eximium</i>	<i>Capsicum minutiflorum</i>
<i>Capsicum buforum</i>	<i>Capsicum exile</i>	<i>Capsicum mirabile</i>
<i>Capsicum brasilianum</i>	<i>Capsicum fasciculatum</i>	<i>Capsicum mositicum</i>
<i>Capsicum campylopodium</i>	<i>Capsicum fastigiatum</i>	<i>Capsicum parvifolium</i>
<i>Capsicum cardenasii</i>	<i>Capsicum flexuosum</i>	<i>Capsicum pubescens</i>
<i>Capsicum chacoense</i>	<i>Capsicum frutescens</i>	<i>Capsicum schottianum</i>
<i>Capsicum chinense</i>	<i>Capsicum galapagoense</i>	<i>Capsicum scolnikianum</i>
<i>Capsicum chlorocladium</i>	<i>Capsicum geminifolium</i>	<i>Capsicum tetragonum</i>
<i>Capsicum ciliatum</i>	<i>Capsicum hookerianum</i>	<i>Capsicum tovarii</i>
<i>Capsicum coccineum</i>	<i>Capsicum lanceolatum</i>	<i>Capsicum villosum</i>

■ Principais espécies cultivadas do gênero *Capsicum* no continente americano, inclusive no Brasil.

Segundo Ribeiro et al. (2008), as pimentas fazem parte da biodiversidade e da riqueza cultural brasileira. No Brasil, todas as regiões brasileiras são produtoras e consumidoras de pimenta (*Capsicum spp.*), sendo a produção destinada tanto para o consumo *in natura*, como para o processamento (Dutra et al., 2007).

As pimentas são largamente utilizadas industrialmente como corantes, aromatizantes, conservantes, componentes de molhos, sopas, carnes processadas, doces e em bebidas alcoólicas (Kollmannsberger et al., 2011; Pino et al., 2007). Além disso, as características de pungência e aroma, juntamente com sua grande variedade de cores, formas e tamanhos, favorecem o uso de pimentas na elaboração de vários alimentos (Di Cagno et al., 2009). As pimentas também são muito usadas para tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar, assim como são utilizadas para aumentar o tempo de vida útil de alimentos e são fontes de antioxidantes naturais (Reifschneider, 2000).

Estes frutos apresentam uma série de compostos benéficos à saúde, tais como vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos e capsaicinoides (Wahyuni et al., 2011; Oyagbemi et al., 2010; Edge et al., 1997; Rice- Evans et al., 1997). Nesse sentido, é crescente o interesse dos consumidores pelas pimentas do gênero *Capsicum*, não só por sua pungência, sabor e aroma, mas também pela diversidade de propriedades nutricionais, funcionais e sua aplicação na indústria de alimentos, na farmacologia, na odontologia e na medicina (Pinto et al., 2013).

A espécie *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*, é popularmente conhecida no Brasil como: “Pimenta-chapéu-de-frade” e “pimenta-dedo-de-moça”. A pimenta chapéu-de-frade é uma pimenta com baixo teor de capsaicina e por isso é considerada uma pimenta doce, já a pimenta dedo-de-moça tem quantidades variáveis de capsaicina variando de moderado a alto e por isso é considerada uma pimenta picante (Wahyuni et al., 2013).

C. baccatum var. *pendulum*, estudada nesse trabalho, é amplamente difundida nas regiões tropicais da América do Sul (Basu e De, 2003) e inclusive no Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste (Bogusz et al., 2012). Apresenta corola branca com manchas amareladas ou esverdeadas, anteras amarelas, uma flor por nó, caule ereto, frutos largos, pendentes e persistentes (Albrecht et al., 2012a; Albrecht et al., 2012b; Jarret, 2007; Carvalho et al., 2006). Os cálices dos frutos maduros são dentados e não possuem constrição anelar na junção do pedicelo. Os frutos (Figura 5) são do tipo baga, podendo apresentar várias formas e cores, geralmente quando imaturos possuem a coloração verde e quando maduros a coloração vermelha podendo variar. Com relação à polpa, esta apresenta consistência firme e as sementes se caracterizam pela coloração cor de palha. Suas flores (Figura 6) são isoladas, pequenas, hermafroditas e se

apresentam de uma a duas por nó. Na antese, os pedicelos são geralmente eretos. A corola é branca e sempre apresenta um par de manchas amarelas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas e as anteras são amarelas (Carvalho e Biachetti, 2004).



Figura 5. Fruto de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.



Figura 6. Flor de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Os resultados obtidos, a partir das análises por CLAE, oriundos do extrato etanólico da espécie *Capsicum baccatum*, mostraram que o acesso 1613, se destacou dos demais acessos, por apresentar o maior teor das substâncias fenólicas analisadas (Assis, 2014). E por essa razão, o acesso 1613 foi o acesso selecionado como alvo de estudo, e desta forma, será a amostra utilizada para a validação de metodologia, por estar presente três dos padrões avaliados: ácido clorogênico (Figura 7), quercetina (Figura 8) e rutina (Figura 9).

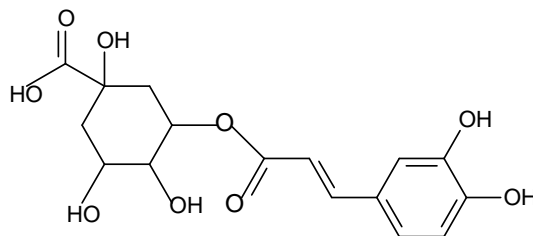


Figura 7. Estrutura química do ácido clorogênico.

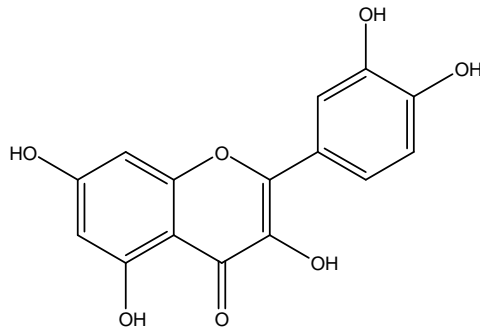


Figura 8. Estrutura química do flavonoide quercetina.

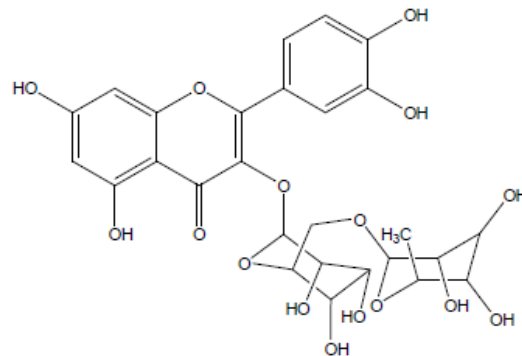


Figura 9. Estrutura química do flavonoide rutina.

Há relatos na literatura quanto à presença destas substâncias em pimentas do gênero *Capsicum*, embora para a espécie *C. baccatum*, sejam poucos. Dentre estes relatos, pode-se citar o trabalho de Wahyuni et al. (2011), que observaram a presença do flavonoide quercetina, e o trabalho de Kappel (2008), que em uma análise do perfil químico, verificou a presença do ácido clorogênico, do ácido caféico e da rutina.

No entanto, não foram observados relatos na literatura sobre a quantificação de moléculas fenólicas, como os flavonoides quercetina e rutina, e o ácido clorogênico para pimentas da espécie *C. baccatum*, a fim de se comparar com os resultados obtidos no trabalho realizado por Assis (2014).

3.4 Composição Química

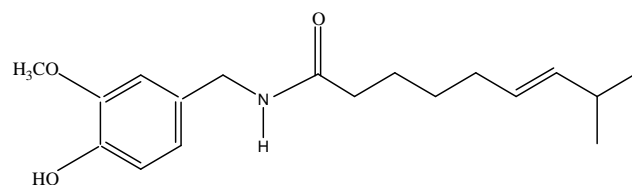
Nos últimos anos, as espécies do gênero *Capsicum* têm atraído o interesse de pesquisadores, tanto por serem utilizadas como especiarias quanto também das diversas aplicações terapêuticas, como nos casos para o tratamento de

artrite, reumatismo, dor de estômago, erupções na pele, mordidas de cobra, no tratamento de feridas, entre outras (Meghvansi et al., 2010).

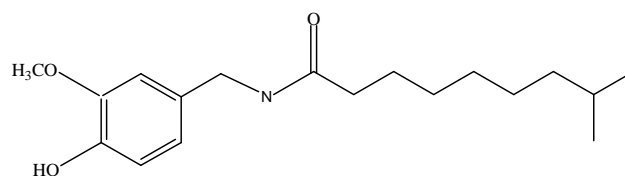
Estas diversas aplicações são atribuídas devido à presença de uma grande variedade de componentes químicos em sua composição, tais como a capsaicina e seus análogos estruturais (os capsaicinoides), os carotenoides, os polifenóis e vários componentes voláteis, especialmente as pirazinas e os ácidos orgânicos (Nuñez-Ramizes et al., 2011; Topuz et al., 2011; Wahyuni et al., 2011).

Neitzke (2012) relata que os frutos de pimentas do gênero *Capsicum* são fontes importantes de antioxidantes naturais, tanto como os carotenoides, quanto vitamina C, antocianinas e vitamina E.

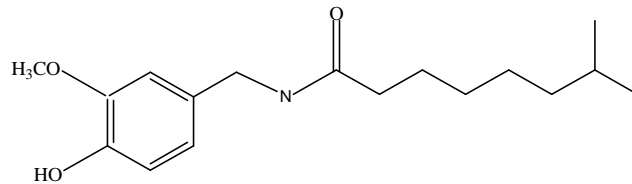
Estas pimentas também são ricas em capsaicinoides, alcaloides presentes, responsáveis pelo sabor picante, quente ou ardente e possuem propriedades antioxidantes, antiinflamatória, antimutagênica, quimiopreventiva (Pinto et al., 2013) e efeito antibactericida em determinados grupos de bactérias (Topuz e Ozdemir, 2004). Dentre os vários capsaicinoides, dois são predominantes: capsaicina e dihidrocapsaicina (Giuffrida et al., 2013; Meckelmann et al., 2013; Topuz; Ozdemir, 2007). Meckelmann et al. (2013) demonstraram que a capsacina representou 55% a 70% e a diidrocapsacina 27% a 40% dos capsaicinoides, de 36 variedades de *Capsicum baccatum* (Figura 10).



Capsaicina



Diidrocapsaicina



Nordiidrocapsaicina

Figura 10. Estrutura química de alguns capsaicinoides que ocorrem em maior quantidade no gênero *Capsicum*. (Fonte: Giuffrida et al., 2013).

Nos últimos anos é crescente a preocupação com o papel da dieta na saúde e na qualidade de vida, sendo cada vez maior o interesse por produtos naturais que venham a contribuir com diferentes propriedades biológicas benéficas à saúde. A comunidade científica, impulsionada por essa perspectiva, tem voltado suas pesquisas para a busca de compostos bioativos presentes, principalmente, em produtos naturais (Melo, 2010).

Estudos mostram que de fato, as pimentas além da grande utilização como tempero e seus efeitos analgésicos reconhecidos, também exibem uma extensa gama de propriedades fisiológicas e farmacológicas, como propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e hipocolesterolêmicas provavelmente associadas à presença de capsaicinoides, de vitaminas e de polifenóis (Arora et al., 2011; López et al., 2012; Oliveira, 2011; Kappel, 2008).

Logo, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com especiarias visando um estudo mais aprofundado dos seus constituintes, seus mecanismos de ação e, possivelmente, aplicações de interesse industrial principalmente devido às suas propriedades antioxidantes (Mariuti e Bragagnolo, 2007; Porte e Godoy, 2008; Hubaib et al., 2002).

Nesse contexto, destacam-se os compostos fenólicos, amplamente encontrados na natureza como produtos do metabolismo secundário das plantas, e que apresentam diversas propriedades biológicas benéficas (Melo, 2010).

3.5 Compostos Fenólicos

De acordo com Taiz e Zeiger (2013) os compostos fenólicos formam um grupo quimicamente heterogêneo e bastante representativo no reino vegetal, com

aproximadamente dez mil compostos. Esses compostos são formados por um grupo fenol, o qual se caracteriza por uma hidroxila funcional ligada a um anel aromático (Figura 11).

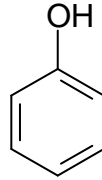


Figura 11. Estrutura química do fenol. (Fonte: Taiz e Zeiger, 2013).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, divididos em duas categorias: pouco distribuídos na natureza, e polímeros largamente distribuídos na natureza. No primeiro grupo, encontra-se um número bem reduzido, embora com uma certa frequência. Nesse grupo, estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a essa família os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina (Moreira e Mancini-Filho, 2004).

Dentre os compostos largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal, esse grupo pode se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (Angelo e Jorge, 2007).

Sabe-se que os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo vegetal e integram um amplo e complexo grupo de fitoquímicos. Além disso, são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (Torras-Claveria et al., 2012).

Esses compostos são originalmente obtidos nos vegetais por duas vias: a do ácido chiquímico e a do ácido malônico, sendo a primeira via, responsável pela produção da maior parte desses derivados. A partir do aminoácido fenilalanina (ou tirosina), a fenilalanina amônia liase remove uma amônia, convertendo o aminoácido em ácido *trans*-cinâmico, precursor da síntese de inúmeros fenilpropanoides, pertencentes a diferentes classes de compostos fenólicos, como

flavonoides, ligninas, taninos, entre outros (Haida et al., 2011; Croteau et al., 2009).

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias com atividade biológica mais estudada em alimentos. Possuem influência direta sobre parâmetros sensoriais, tais como conferência de cor e adstringência (Fernandez- Panchon et al., 2011).

Altos teores de fenólicos em pimentas do gênero *Capsicum* são relatados na literatura (Rodríguez-Burruezo et al., 2009; Kappel et al., 2008; Oboh; Rocha, 2007; Suchandra, et al., 2007). Em molho fermentado de pimenta dedo-de-moça foram registrados teores de 0,37 mg/g equivalente de ácido gálico (EAG) (Moraes et al., 2012), enquanto no fruto *in natura* alcançaram 1,4 mg/g EAG (Antonious et al., 2006).

Em *Capsicum* são encontrados diferentes tipos de compostos fenólicos. Bae et al. (2012) em seu estudo quantificaram que os principais compostos fenólicos encontrados em *Capsicum* são os flavonoides mirecetina, quercetina, luteolina, kaempferol e apigenina. Já Zhuang et al. (2012), em seu estudo encontraram como compostos fenólicos majoritários, ácido gálico e o ácido benzoico.

A quantificação de compostos fenólicos pode ser avaliada por meio de uma variedade de métodos. Todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é o mais extensivamente empregado. Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco, na qual, o molibdênio se encontra no estado de oxidação (coloração amarela), porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Oliveira et al., 2009). Segundo os mesmos autores, o que ocorre é a desprotonação dos compostos fenólicos em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre ânion fenolato e o reagente Folin, na qual, o molibdênio sofre redução e o meio reacional muda de coloração amarela para azul.

Os compostos fenólicos são reconhecidos por possuírem efeitos benéficos à saúde humana, tal capacidade se deve em virtude de sua natureza química, atuam como agentes redutores, interrompendo a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-

os em produtos termodinamicamente estáveis, ou complexando com metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica (Melo et al., 2008).

Essa atividade, por sua vez, dependerá das suas estruturas químicas, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor, velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potenciais de quelação de metais (Oldoni, 2010).

Como resultado de sua atuação, esses antioxidantes fenólicos formam produtos intermediários estáveis, e se caracterizam por inibirem a oxidação de vários ingredientes do alimento, em principal os lipídios (Oldoni, 2010). Entretanto, os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, seja pela ação de enzimas vegetais específicas ou pela influência de metais, radiação UV, calor ou meio alcalino (Carpes, 2008).

Sob vários aspectos, as substâncias fenólicas vêm demonstrando resultados promissores como poderosos antioxidantes, os quais podem proteger o corpo humano de radicais livres, cuja formação é associada ao metabolismo normal das células aeróbicas. Além disso, os efeitos das moléculas fenólicas presentes em diversos alimentos são muito amplos (Koo e Suhaila, 2001). Os fenólicos são responsáveis pela remoção de radicais livres, neutralizando espécies reativas de oxigênio, assim sendo de grande importância para a indústria alimentícia, onde atuam principalmente na conservação dos alimentos aumentando o tempo de estocagem, reduzindo as perdas nutricionais e protegendo os alimentos da oxidação (Zhong e Shahidi, 2012).

Por isto, há um grande interesse em detectar nas espécies vegetais utilizadas como condimentos, princípios ativos que possuam ação antioxidante e que possam contribuir para aumentar o tempo de prateleira de alimentos, sendo estes produzidos sem danos ao meio ambiente e à saúde humana (Costa et al., 2009).

Desta forma, pesquisas vêm demonstrando o grande potencial dos compostos fenólicos, em especial os flavonoides, que são amplamente distribuídos em plantas e têm mostrado exercer importantes atividades ao longo dos anos (Soares 2013; Ibrahim et al., 2012; Clavin et al., 2007; Pelzer et al., 1998). Os flavonoides são os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (Soobrattee et al., 2005) e também os mais abundantes na alimentação.

Estima-se um consumo diário em torno de 26 mg e 1 g/dia de flavonoides (Sesso et al., 2003), baseado no consumo de fontes específicas como vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias. A quercetina, o mais abundante flavonoide presente na dieta humana, representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos (Nijveldt et al., 2001).

3.5.1 Flavonoides

Entende-se por flavonoides, compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenoides, ácidos graxos, entre outros (Zuanazzi e Montanha, 2010). A figura 12 apresenta as rotas de biossíntese dos flavonoides.

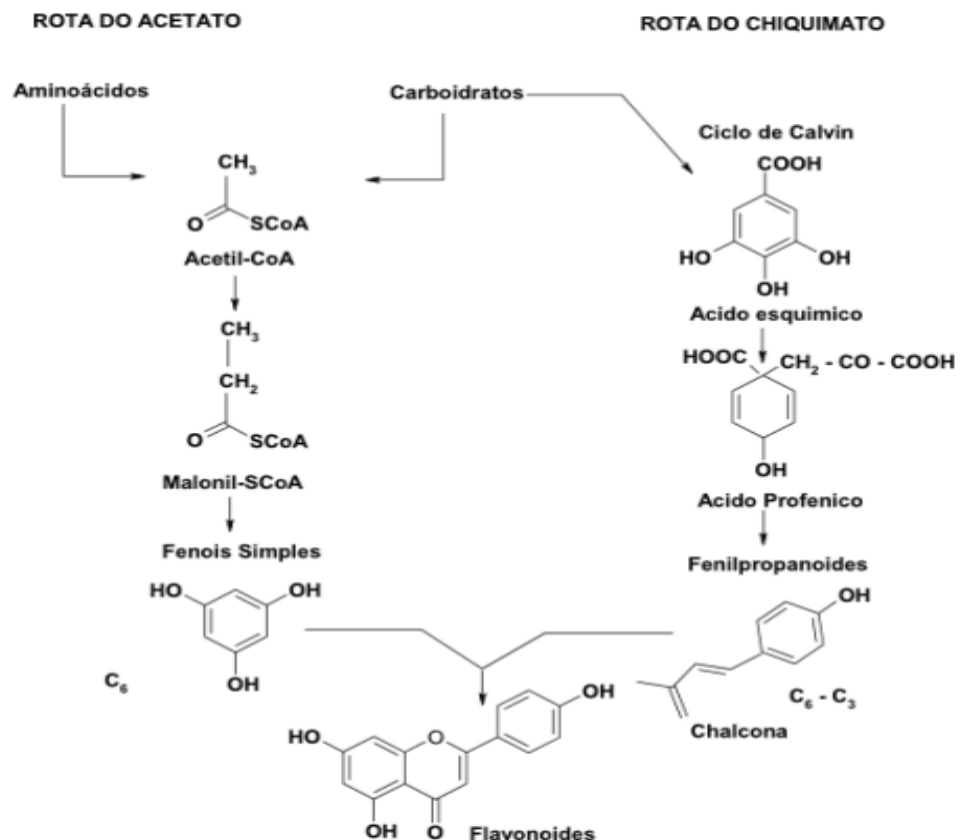


Figura 12. Rota biossintética simplificada dos compostos fenólicos.

(Fonte: Escarpa e Gonzalez, 2001).

Esse grupo compreende compostos polifenólicos de baixo peso molecular contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental como mostra a Figura 13 (Reis, 2011).

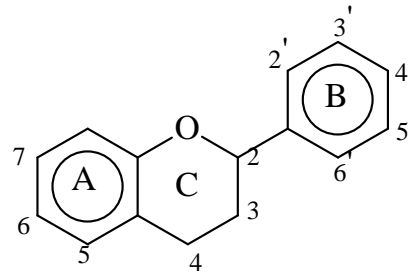


Figura 13. Estrutura básica dos flavonoides (Reis, 2011).

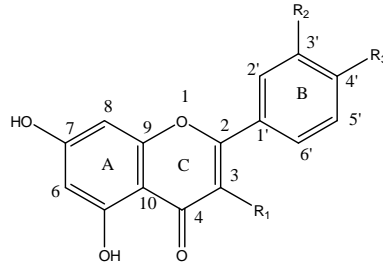
Os flavonoides são classificados de acordo com as suas características químicas e biossintéticas. As maiores classes de flavonoides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas (Harborne, 1994) (Figura 14).

Essas substâncias são distribuídas largamente nas folhas, sementes, raízes e flores das plantas. Mais de 10.000 estruturas de flavonoides já foram descobertas (Agati et al., 2012). É interessante salientar, que a atividade bioquímica dos flavonoides e seus metabólitos dependem da estrutura química e da orientação relativa dos grupamentos na molécula. Nas plantas, os flavonoides têm a função de absorver a radiação UV prejudicial que pode induzir um dano celular (Soares, 2013).

Ainda estão envolvidos na fotossíntese, na ação dos hormônios do crescimento das plantas, na expressão gênica e na atração de animais com finalidade de polinização (Harborne, 1994).

De acordo com a Embrapa (2010), um fruto que representa uma rica fonte de flavonoides é o fruto da pimenta (*Capsicum*). Dessa forma, os flavonoides, têm seu mecanismo de ação investigado, na busca de identificar qual é sua relação com as propriedades benéficas apresentadas (Moraes, 2013; Dani et al., 2010).

1a e 1b

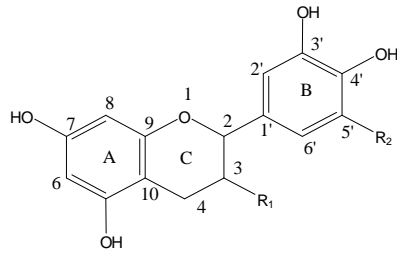
**1a – Flavonóis**

	R ₁	R ₂	R ₃
Quercetina	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	H	OH

1b – Flavonas

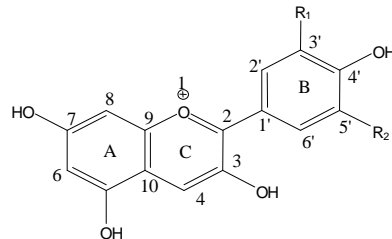
Luteolina	H	OH	OH
Apigenina	H	H	OH

2

**2 – Flavanóis**

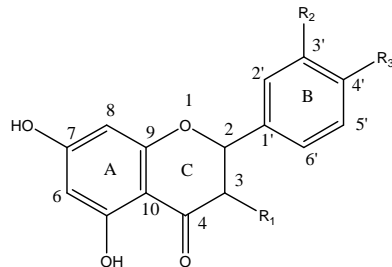
	R ₁	R ₂
Catequina	OH	H
Epicatequina	OH	H

3

**3 - Antocianidina**

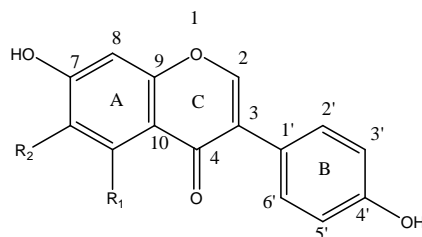
Cianidina	OH	H
Malvidina	OCH ₃	HCH ₃

4

**4 – Flavanonas**

	R ₁	R ₂	R ₃
Hesperetina	H	OH	OCH ₃
Naringenina	H	H	OH

5

**5 - Isoflavonas**

	R ₁	R ₂
Daidzeína	H	H
Genisteína	OH	H
Gliciteína	H	OCH ₃

Figura 14. Estrutura das principais classes de flavonoides.

Nos seres humanos, os flavonoides têm sido descritos por exercer efeitos benéficos em diversas doenças incluindo câncer, desordens neurodegenerativas

e doenças cardiovasculares. Muitas das ações biológicas dos flavonoides têm sido atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, através da capacidade de redução, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular. Esses compostos, em virtude de seus radicais intermediários estáveis, impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (Degáspari e Waszczynskyj, 2004; Brand-Williams et al., 1995). A atividade antioxidante parece estar diretamente relacionada com o número de grupamento hidroxila no núcleo B (Soares, 2013; Williams et al., 2004; Husain et al., 1987).

Além disso, sob vários aspectos, os flavonoides são conhecidos por exibir propriedades farmacológicas como anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e analgésica (Soares, 2013; Ibrahim et al., 2012; Clavin et al., 2007; Pelzer et al., 1998).

Desta forma, é possível perceber a importância do presente trabalho, visto sua contribuição fundamental para o âmbito da ciência e tecnologia de alimentos tanto no aspecto de validação da metodologia quanto em relação ao avanço químico acerca desta espécie vegetal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) pertencente a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes – RJ, no período de abril a novembro de 2015.

4.1 Genótipo Utilizado

As sementes inicialmente foram depositadas na casa de vegetação da UENF, sob supervisão da Prof.^a Dr^a Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV). Os frutos maduros foram retirados da planta e acondicionados em sacos de papel devidamente identificados, onde seguiram para as análises no LTA do CCTA. O genótipo utilizado foi constituído do acesso 1613 de *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do CCTA da UENF.

4.2 Preparo dos Extratos

O método de extração foi adaptado de acordo com a metodologia de Zimmer et al. (2012) a partir da produção de oleorresinas. A oleorresina é um

extrato obtido com solvente orgânico que apresenta substâncias responsáveis pela pungência e por conter substâncias que podem atuar como antioxidantes, além de ser estéril e estável durante o armazenamento.

Os frutos, inicialmente, foram limpos, separados manualmente das sementes e levados à estufa de circulação de ar a 40°C durante sete dias. Após secos, os frutos foram triturados com o auxílio de almofariz e pistilo e armazenados em dessecador, ao abrigo da luz, em sacos de papel devidamente identificados e armazenados até seguirem para a extração.

Para o preparo desses extratos etanólicos, após secos e triturados, os frutos foram submetidos a refluxo em extrator tipo Soxhlet com etanol 70% (1:10, p/v) por 4 horas. Os extratos foram evaporados em rota evaporador a 79°C, armazenados em frascos de vidro ao abrigo da luz e refrigerados, de onde seguiram para as demais análises, conforme mostrado pela Figura 15.



Figura 15. Esquema da obtenção dos extratos etanólicos dos frutos de *Capsicum baccatum*. CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4.3 Quantificação das Substâncias Fenólicas por CLAE

A quantificação das substâncias fenólicas do extrato etanólico obtido a partir do acesso 1613 foi feita utilizando-se a CLAE, conforme Assis (2014).

Os padrões das substâncias fenólicas e os extratos obtidos da amostra foram analisados em Cromatógrafo Líquido marca Shimadzu, modelo LC-20A, bombas LC20AD, sendo os cromatogramas monitorados com variação de 230-400 nm para substâncias fenólicas (detector ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M20A) e volume de injeção de 20 μ L. Foi utilizada a coluna de fase inversa RP-18 da Macherey-Nagel (5 μ m, 4,0 x 250mm).

O método a ser otimizado para a análise e quantificação destas substâncias fenólicas, está descrito na Tabela 4. Para o gradiente de eluição trabalhado, foi utilizado água tipo MiliQ acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) na bomba A e acetonitrila na bomba B, com fluxo de 1 mL/min a 35 °C.

Tabela 4. Gradiente de eluição.

Gradiente 1- Bomba A: água MiliQ acidificada; Bomba B: Acetonitrila	
Tempo (min)	Concentração da bomba B (%)
0,01	0
5,00	30
10,00	50
15,00	70
20,00	80
25,00	90
30,00	100
32,00	0

4.4 Preparo das Amostras

Na preparação das amostras a serem injetadas, pesou-se 10 mg de extrato e solubilizou-se em 1 ml da fase móvel (500 μ l água MiliQ acidificada e 500 μ l da acetonitrila). Os extratos foram filtrados com o auxílio de microfiltros (Sartórios) e seringas descartáveis (BD Plastipak), depois injetados de acordo com o método.

As substâncias fenólicas quantificadas foram o ácido clorogênico, rutina e quercetina (Tabela 5). A escolha destes foi feita com base em continuação do trabalho realizado por Assis (2014), em que se constatou a presença destas substâncias fenólicas em pimentas da espécie *Capsicum baccatum*.

Tabela 5. Padrões Fenólicos utilizados para quantificação.

Padrões Fenólicos	Marca
Ácido Clorogênico	Sigma-Aldrich
Quercetina	Merck
Rutina	Merck

Para cada um destes padrões fenólicos foram feitas curvas de calibração (área do pico X massa em μg) com seis concentrações diferentes (50 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ e 2 $\mu\text{g/ml}$), conforme proposto o parâmetro de linearidade. Estas concentrações foram definidas com base em concentrações encontradas por outros pesquisadores em análises realizadas por CLAE nesta mesma espécie de pimenta.

Para identificação e quantificação das substâncias fenólicas nas amostras, foram feitas comparações dos tempos de retenção encontrados nas amostras com os tempos de retenção dos padrões comerciais puros. Após esta análise preliminar, foram feitas co-injeções das amostras adicionadas de padrões puros e analisados novamente seus tempos de retenção. Também foram feitas comparações entre os espectros de Ultravioleta das substâncias analisadas nas amostras com os espectros dos padrões comerciais, para comprovação das substâncias.

4.5 Validação do Método Analítico por CLAE

A validação do método analítico foi realizada segundo os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE nº 899 de 2003. Os parâmetros analíticos avaliados para o desenvolvimento deste trabalho foram: linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.5.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade foram obtidas curvas analíticas utilizando a padronização externa, a partir de 6 pontos das soluções padrão de ácido clorogênico, quercetina e rutina nas concentrações de 0,2 a 50 µg/ml, preparadas no mesmo dia em que se realizaram as análises. Os padrões foram preparados em triplicata e cada uma das replicatas foi injetada 3 vezes. A curva analítica para cada substância fenólica foi obtida por correlação entre concentração e área, através do método linear dos mínimos quadrados.

4.5.2 Seletividade

Nos estudos de seletividade, foi aplicado o método de adição de padrão. Foram preparadas duas curvas analíticas: a curva A constituída das soluções de trabalho mistas, ou seja, padrões de ácido clorogênico e os flavonoides quercetina e rutina, na faixa de concentração de 2 a 50 µg/ml (n= 5 pontos) e a curva B, contendo 500µl das soluções de trabalho mistas da curva A, diluídas com 500 µl da amostra pimenta. Em seguida, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas foram comparados.

4.5.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste método, o limite de detecção (LD) pode ser expresso como na Equação 1:

$$LD = 3,3 \times s/a \quad (1)$$

onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a é o coeficiente angular da curva analítica.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado a partir da Equação 2:

$$LQ = 10 \times s/a \quad (2)$$

Para calcular estes dados, uma curva analítica foi construída utilizando a matriz contendo a solução padrão de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Portanto, foram obtidas curvas analíticas, na faixa de concentração de 0,2-50 µg/ml (n=6 pontos), faixa contendo o limite de detecção experimental das soluções padrão de ácido clorogênico, quercetina e rutina e, em seguida, calculados os respectivos parâmetros das curvas.

4.5.4 Precisão

Para a determinação da precisão, foram realizados ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

Repetitividade (precisão intraensaio): para se avaliar a repetitividade analítica do método empregada na análise, prepararam-se cinco amostras de soluções padrão (ácido clorogênico, quercetina e rutina), contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 níveis de concentração (2, 10 e 50 µg/ml), em triplicatas cada uma. Essas foram injetadas em cinco repetições no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. As respostas foram expressas como o desvio padrão relativo (DPR).

Precisão intermediária (precisão interensaio): para a verificação deste parâmetro, foram utilizadas soluções de ácido clorogênico, quercetina e rutina, às quais foram preparadas cinco amostras (2, 10 e 50 µg/ml), em triplicatas cada uma. Essas foram injetadas em cinco repetições, por dois analistas em diferentes dias. Os resultados foram expressos como o desvio padrão relativo (DPR).

4.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação, comparando-se a amostra pura (extrato de pimenta) e a mesma amostra adicionado de diferentes concentrações conhecidas das substâncias padrão estudado.

O método de adição padrão foi utilizado, pois não é possível obter a matriz isenta do analito. Para isso, quantidades de cada substância padrão,

aproximadamente, igual a 1; 1,5 e 2 vezes, encontradas na amostra original, foram adicionadas à amostra original. A porcentagem de recuperação (%R) foi calculada subtraindo-se a concentração determinada na amostra adicionada (C2) da concentração determinada na amostra não adicionada (C1), dividindo-se pela concentração adicionada (C3), multiplicando-se por 100, conforme Equação 3:

$$\%R = (C_2 - C_1 / C_3) \times 100 \quad (3)$$

4.5.6 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada em um planejamento fatorial em dois níveis 2^3 conforme Tabela 6. Os parâmetros avaliados foram variação na velocidade de fluxo (0,8; 1,0 e 1,2) e temperatura do forno (30°C; 35°C e 40°C). Em cada condição estabelecida foi injetado em triplicata o ponto de concentração intermediária (25ug/ml ácido clorogênico; 25ug/ml quercetina e rutina 25 ug/ml) e avaliado quanto à sensibilidade e resolução dos analitos.

Tabela 6. Variações nas condições cromatográficas na quantificação das substâncias fenólicas por CLAE.

Parâmetro	Condições	Condições (Normal)	Condições
Fluxo	0,8	1,0	1,2
Temperatura do forno	30°C	35°C	40°C

4.6 Análises Estatísticas

Para a comparação dos fatores qualitativos com relação ao parâmetro de precisão, utilizaram-se os testes de Tukey em nível de 5% de significância. No parâmetro de robustez, foi aplicado o delineamento em blocos casualizados (DBC) em arranjo fatorial 3x3 (três velocidade de fluxo e três temperaturas do forno) para os fatores quantitativos. Os graus de liberdade dos fatores em estudo foram desdobrados via análise de regressão. O nível de significância estatística aplicado de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): Substâncias de referência presentes em *C. bacatum*

Com o intuito de conhecer o perfil químico com relação às moléculas fenólicas, as amostras foram submetidas a CLAE. Foram usados 3 padrões de substâncias fenólicas, já que essas moléculas foram detectadas e quantificadas anteriormente em acessos de *C. bacatum*, além de apresentarem atividade antioxidante (Assis, 2014; O'Prey et al., 2003), a saber:

- *Ácido clorogênico*: ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido cinâmico com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5- tetra-hidroxi-ciclohexanóico);
- *Quercetina*: flavonol penta-hidroxilado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4';
- *Rutina*: flavonoide que possui o esqueleto semelhante ao da quercetina, se diferenciando pela presença de duas unidades de açúcares (glicose interna e ramnose externa) ligados na posição 3 do flavonoide.

Os dados obtidos a partir da CLAE para os padrões fenólicos e do acesso 1613 de *C. baccatum*, avaliado neste estudo, com os respectivos tempos de retenção, comprimentos de onda e os percentuais de área demonstrando o grau de pureza, estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Tempos de retenção (T_R), comprimentos de onda (λ máx.) e percentual de área (Área %) dos padrões fenólicos e do acesso 1613 de pimenta, analisados por CLAE.

	T_R (Minutos)	(λ) max (nm)	Área %
Ácido Clorogênico (Padrão)	6.038	326	100
Ácido Clorogênico (Acesso 1613)	6.253	274	9.768
Rutina (Padrão)	7.174	255; 354	100
Rutina (Acesso 1613)	7.292	255; 343	76.123
Quercetina (Padrão)	10.616	255; 369	100
Quercetina (Acesso 1613)	10.626	255; 359	14.1d09

No presente trabalho, pode-se observar o perfil químico do acesso 1613 (Figura 16) e dos padrões fenólicos (Figuras 17 - 19), avaliados por CLAE, assim como os respectivos espectros de absorção no UV. Vale ressaltar a importância do solvente escolhido para a extração destes compostos fenólicos no acesso 1613 de pimenta. Esta extração foi realizada utilizando-se etanol de acordo com a polaridade do extrato, visto que a extração de maior quantidade destes compostos fenólicos pode ser explicada pelo fato de solventes mais polares, extraírem normalmente maior quantidade de fenólicos (Bertoldi, 2006).

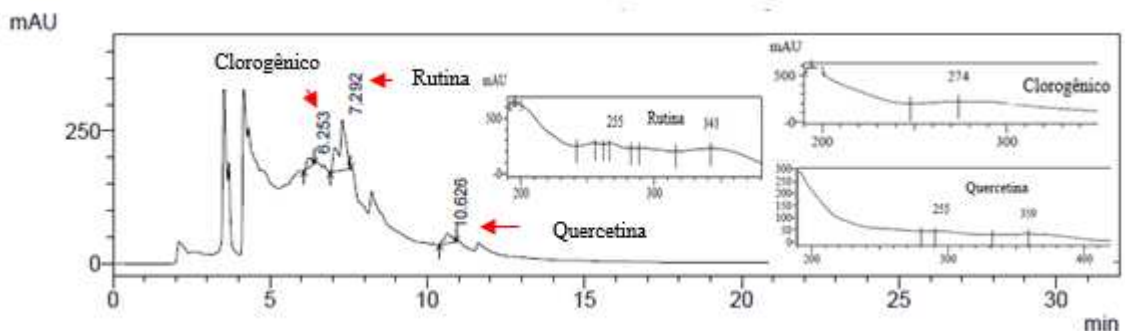


Figura 16: Cromatograma do acesso 1613 avaliado por CLAE e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, quercetina e rutina.

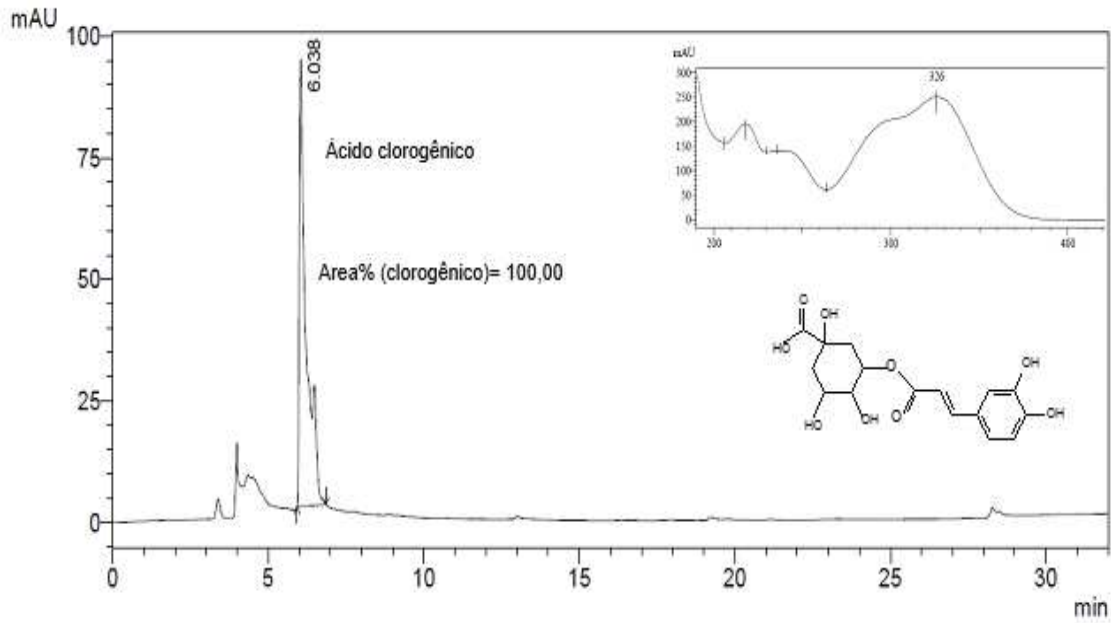


Figura 17. Cromatograma do padrão de Ácido Clorogênico (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.

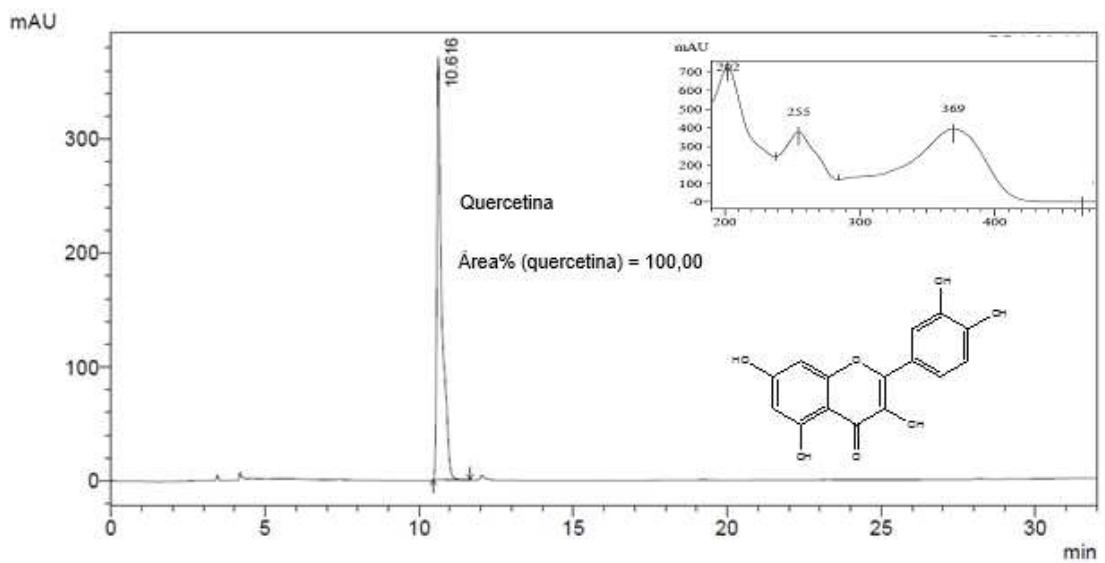


Figura 18. Cromatograma do padrão do flavonoide Quercetina (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.

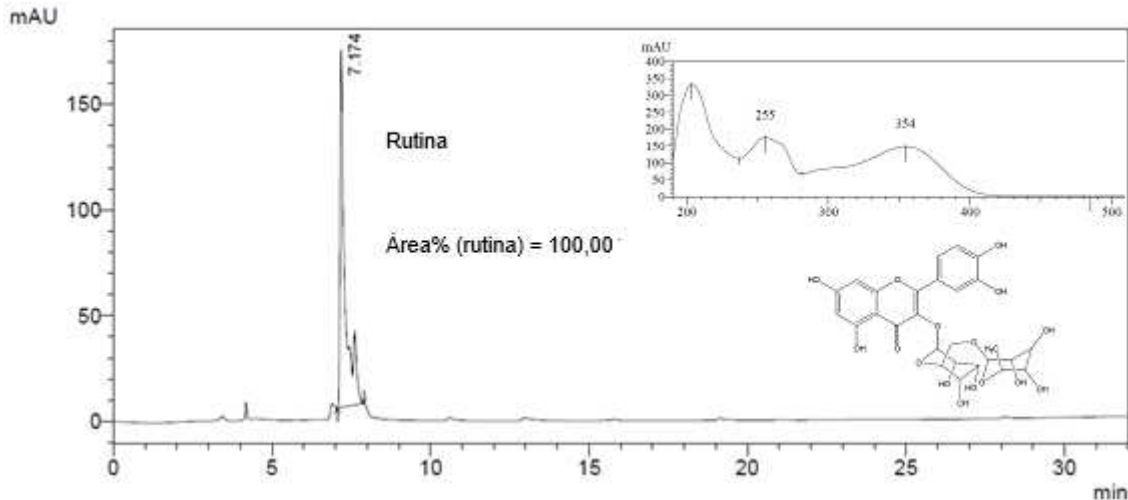


Figura 19. Cromatograma do padrão do flavonoide Rutina (50 µg/ml) e seu respectivo espectro de UV.

Pode-se observar, conforme figura 17, que o ácido clorogênico absorve no comprimento de onda de 350 nm, e que para o sistema de solventes empregado, o pico corresponde em 6,038 minutos. As figuras 18 e 19, mostram que ambas as substâncias padrão absorvem nos comprimentos de onda de 254 e 350 nm, e os picos de ambos os flavonoides (rutina e quercetina) foram tabelados, respectivamente, em 7,174 minutos e 10,616 minutos.

É importante salientar que os compostos fenólicos possuem núcleos aromáticos, apresentando espectros de UV característicos, com um ou mais picos de absorção entre 230 a 290 nm, que por sua vez, ao sofrerem ionização provocada por algum composto básico, estes podem sofrer desvio batocrômico entre 15 e 50 nm, acompanhado de aumento de absorbância (Harborne, 1989).

O ácido clorogênico, derivado do ácido cinâmico (Figura 20), possui espectro de UV, com absorção máxima em torno de 325 nm, como consta na Figura 21.

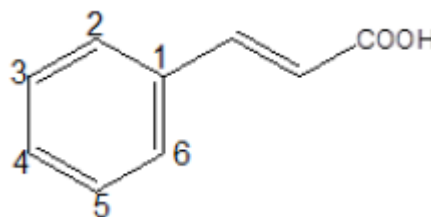


Figura 20. Estrutura química do ácido cinâmico.

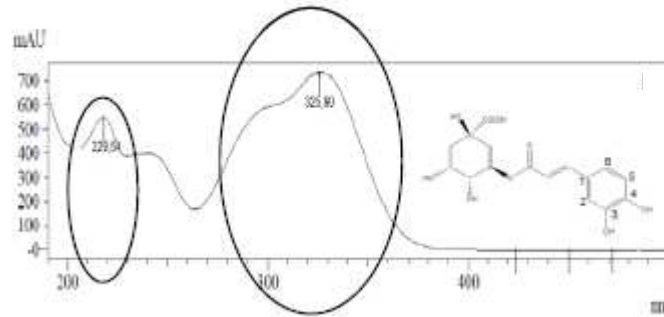


Figura 21. Espectro de UV do ácido cinâmico. Fonte: Lianda, 2009.

Já para os flavonoides, seus espectros no ultravioleta podem ser determinados em etanol ou metanol e estes podem apresentar duas bandas de absorção máxima, uma entre 240 e 285 nm (banda II, devido à absorção do anel A, sistema benzoila) e outra entre 300 e 450 nm (banda I, devido ao anel B, sistema cinamoila), como mostra a Figura 22 (Simões et al., 2000; Harborne, 1994).

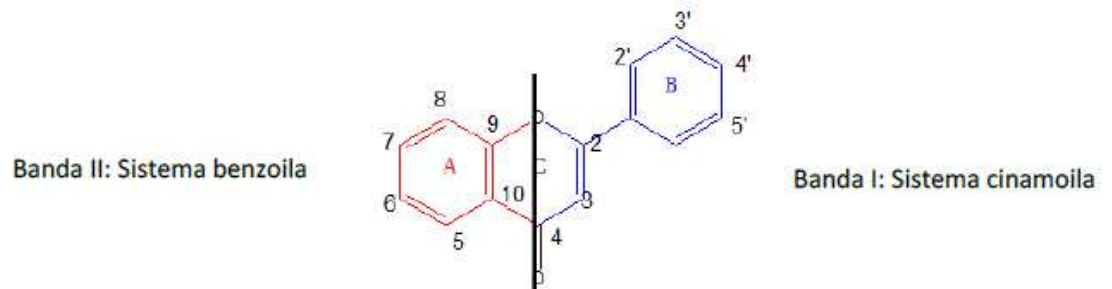


Figura 22. Bandas de absorção no UV dos flavonoides. Fonte: Adaptado de Lianda, 2009.

A intensidade e posição específica de cada um destes comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) podem fornecer informações importantes para identificação do tipo de flavonoide e a posição da oxigenação, visto que, o espectro é afetado principalmente pelo tipo de oxigenação, ou seja, um aumento da oxigenação pode provocar um desvio batocrômico (desvio para maiores comprimentos de onda) (Markham, 1989; Mabry et al., 1970).

Nos espectros de UV obtidos para os padrões dos flavonoides quercetina e rutina (Figuras 18 e 19), verificou-se a presença destas duas bandas características de flavonoides.

Segundo Lianda (2009), quando os grupos hidroxilas nas posições C3, C5 ou C4' dos núcleos das flavonas ou flavonóis são metilados ou glicosilados, ocorrem desvios hipsocrômicos, principalmente na banda de maior comprimento de onda (banda I), fato este que pode ser observado, principalmente, no espectro de UV da rutina ($\lambda = 354$ nm) (Figura 19), comparado ao espectro de UV da quercetina ($\lambda = 369$ nm) (Figura 18), em que apresenta um efeito hipsocrômico de aproximadamente 20 nm, devido à presença do açúcar na posição 3 da aglicona.

Após essa avaliação e conhecimento do comportamento destas moléculas frente ao sistema de solvente escolhido para CLAE, os parâmetros foram determinados para a validação deste método bioanalítico por CLAE.

5.2. Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi analisada frente às três substâncias: ácido clorogênico, quercetina e rutina, utilizadas como substâncias de referência para construção da curva analítica, justificada por ser possível quantificar por CLAE as substâncias fenólicas no acesso 1613 de pimenta da espécie *Capsicum baccatum* da coleção de germoplasma do CCTA da UENF. Outro motivo está relacionado à possível utilização deste extrato na indústria de alimentos como um antioxidante natural.

Desta forma, o parâmetro da linearidade foi obtido por meio da curva analítica (concentração *versus* área do pico) utilizando a padronização externa dos padrões ácido clorogênico, quercetina e rutina na faixa de concentração de 0,2 a 50 $\mu\text{g/mL}$, para a construção de cada curva. Os dados referentes às triplicatas das curvas padrão estão dispostos nas Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Valores referentes à triplicata da curva padrão de ácido clorogênico.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Média	DP	CV (%)
0,2	3.394	2.810	4.748	3.651	0.994	27.23
2	54.494	50.972	57.283	54.250	3.162	5.823
10	214.643	221.857	219.133	218.544	3.643	1.666
25	669.391	622.836	690.390	660.872	34.573	5.231
35	857.586	803.214	734.059	798.286	61.910	7.755
50	1.402.704	1.133.439	1.247.808	1.261.317	135.139	10.714

DP= desvio padrão; CV= Coeficiente de Variação

Tabela 9. Valores referentes à triplicata da curva padrão de quercetina.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Média	DP	CV (%)
0,2	21.649	24.944	30.816	25.803	4.643	17.995
2	154.891	155.897	128.908	146.565	15.299	10.439
10	618.338	692.865	683.358	664.853	40.563	6.101
25	2.090.916	1.958.144	2.328.227	2.125.762	187.486	8.819
35	2.865.483	3.091.820	3.005.407	2.987.570	114.217	3.823
50	4.250.755	4.188.857	4.116.538	4.185.383	67.175	1.605

DP= desvio padrão; CV= Coeficiente de Variação.

Tabela 10. Valores referentes à triplicata da curva padrão de rutina.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Média	DP	CV (%)
0,2	3.491	4.874	4.183	4.183	0.691	16.531
2	48.417	49.927	49.172	49.172	0.755	1.535
10	294.442	239.924	267.716	267.361	27.26	10.196
25	647.309	576.118	563.408	595.612	45.22	7.592
35	821.527	831.929	841.568	831.675	10.023	1.205
50	1.168.252	1.001.051	1.045.778	1.071.694	86.560	8.077

DP= desvio padrão; CV= Coeficiente de Variação.

A metodologia analítica desenvolvida mostrou linearidade, uma vez que foi capaz de apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações de ácido clorogênico, quercetina e rutina presentes nas soluções, mostrando valores de coeficientes de correlação (r^2) iguais a 0,993; 0,998 e 0,993, respectivamente. A linearidade do método, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r^2) para o ácido clorogênico, quercetina e rutina, estão expressos nas Figuras 23A, 23B e 23C.

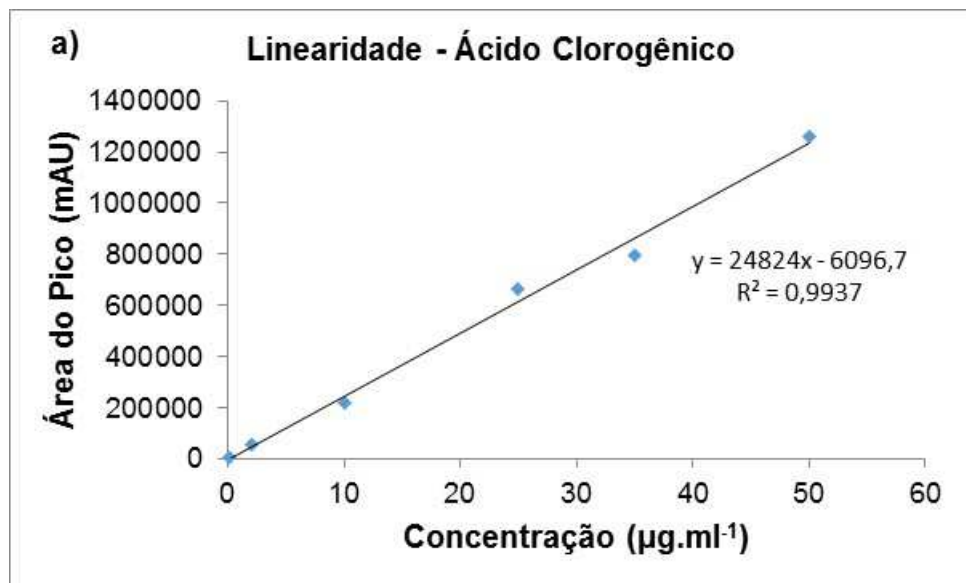


Figura 23A: Curva analítica do padrão ácido clorogênico.

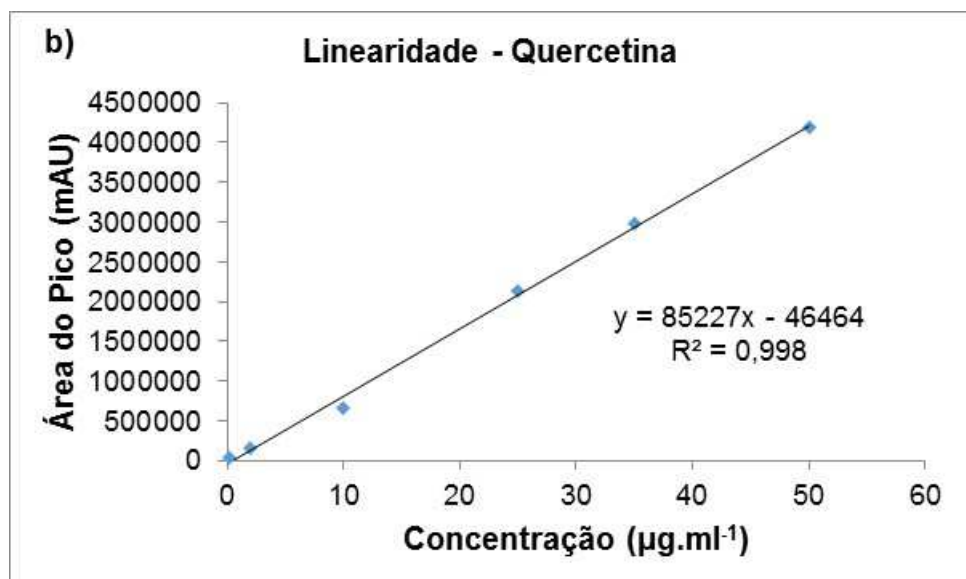
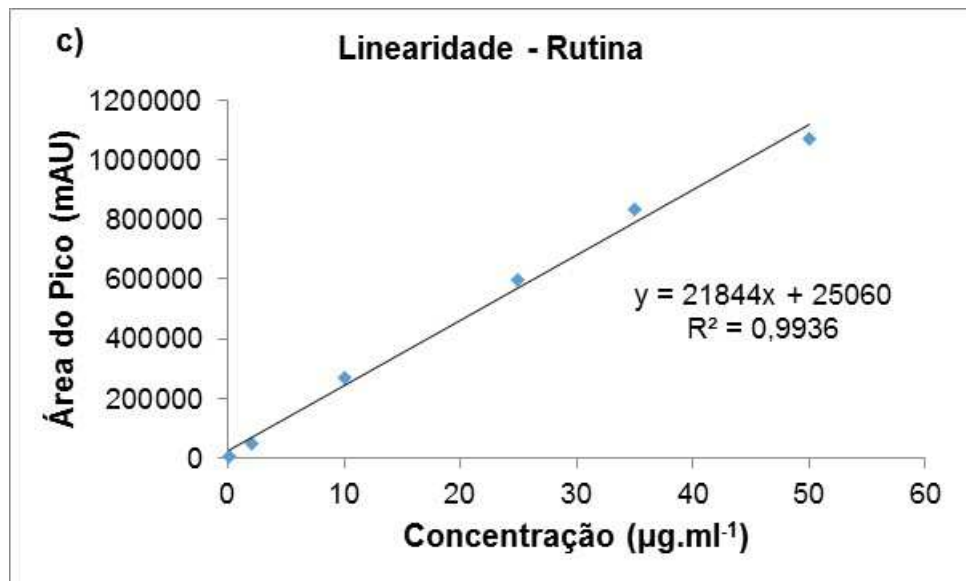


Figura 23B: Curva analítica do padrão quercetina.**Figura 23C:** Curva analítica do padrão rutina.

O coeficiente de correlação demonstrou haver concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas dos picos obtidas. A análise por Anova demonstrou haver regressão linear significativa (a) sem desvio da linearidade (b):

a) F calculado _{Acido Clorogênico} = 885,97 > F tabelado = 18,643; $p < 0,01$

b) F calculado _{Quercetina} = 4461,73 > F tabelado = 18,643; $p < 0,01$

c) F calculado _{Rutina} = 1590,40 > F tabelado = 18,643; $p < 0,01$.

Estes resultados indicam que a linearidade está dentro do intervalo de concentração testada do ácido clorogênico, quercetina e rutina. A correlação dos dados observados nas Figuras 23a, 23b e 23c, apresentou um coeficiente de correlação superior a 0,98 para todas as substâncias padrão estudadas. De acordo com a RDC 899/2003, especialmente no caso de extratos vegetais, a validação deve seguir a metodologia analítica, no entanto, os resultados podem seguir os critérios de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade do extrato vegetal, permitindo limites de

aceitação maiores em relação aos métodos analíticos. Sendo assim, se aceita um coeficiente de correlação linear (r^2) superior ou igual a 0,98 (Anvisa, 2013).

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Guimarães et al. (2007) para a quantificação de ácido clorogênico em folhas de alcachofra por CLAE, apresentando valores de coeficiente de correlação de 0,9908. Ziliotto et al. (2012), demonstraram o coeficiente de correlação médio de 0,999 para a validação de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L.

Na pesquisa de Cardoso (2013), também foi verificada a linearidade dos extratos vegetais de *Lafoensia pacari*. Dentre os compostos fenólicos identificados destaca-se o ácido elágico, presente nas soluções com coeficientes de correlação médios (r^2) iguais a 0,9966.

Estes resultados corroboram com a presente pesquisa, mostrando que as áreas determinadas no método por CLAE foram diretamente proporcionais às concentrações das soluções para a análise das substâncias fenólicas (ácido clorogênico, flavonoides quercetina e rutina). Apesar das pimentas do gênero *Capsicum* serem conhecidas e difundidas em todo o mundo, ainda são escassos os trabalhos que investiguem a fundo a presença destas substâncias fenólicas em frutos das espécies deste gênero.

5.3. Seletividade

A seletividade do método foi comprovada mediante a comparação dos valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas representadas nas Figuras 24A, 24B e 24C.

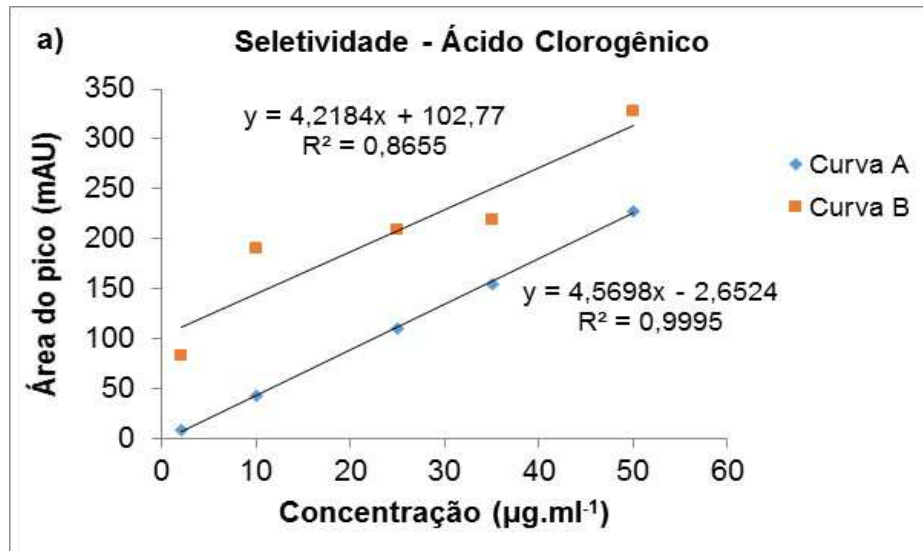


Figura 24A. Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área do ácido clorogênico (Curva B).

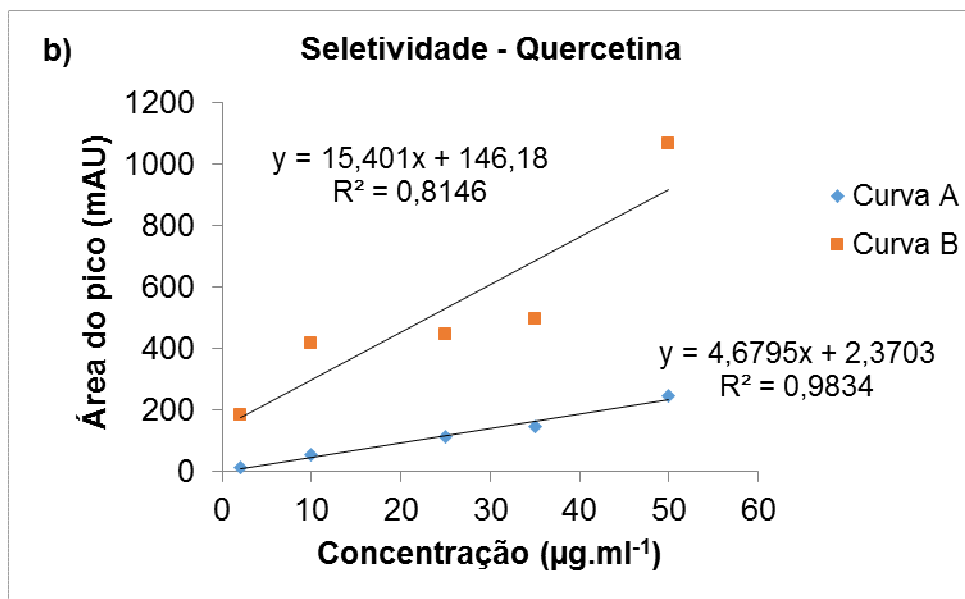


Figura 24B. Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área da quercetina (Curva B).

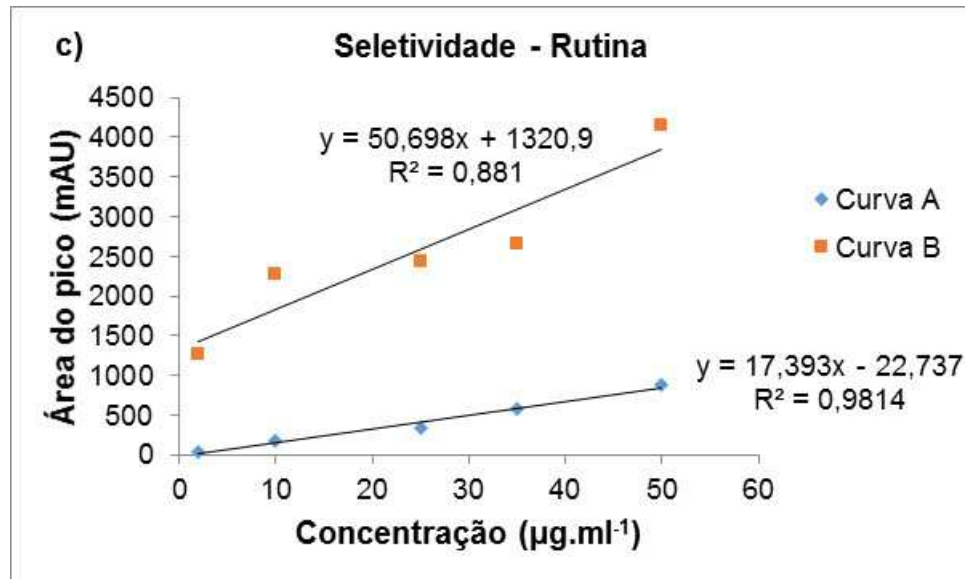


Figura 24C. Curva analítica das soluções de trabalho mistas (Curva A) e da amostra de pimenta (acesso 1613) adicionada às soluções de trabalho mistas relativas à área da rutina (Curva B).

Ao se observar as figuras acima, verifica-se que o método foi seletivo apenas para a quantificação do ácido clorogênico no extrato de *C. baccatum*, uma vez que as inclinações das duas curvas são muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares é igual a 1 (Tabela 11). Neste caso, quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz e, portanto, o método é seletivo (Andrade, 2009).

Entretanto, comparando-se as curvas analíticas, da quercetina e rutina, com coeficientes angulares próximos de 0,3, pode-se dizer que há interferências de outros componentes da matriz, portanto, o método não foi seletivo para a determinação destas substâncias de interesse a partir do extrato etanólico de *C. baccatum* (Inmetro, 2003).

Tabela 11. Avaliação da seletividade de soluções padrão e acesso 1613 de pimenta.

Padrões	Coefficiente angular (Padrão)	Coefficiente angular (Amostra adicionada de padrão)	Razão
---------	-------------------------------	---	-------

Ácido Clorogênico	4,5698	4,2184	1,083
Quercetina	4,6795	15,401	0,303
Rutina	17,393	50,698	0,343

Além disso, para avaliar a seletividade do método, de forma a assegurar que as substâncias presentes na amostra apresentam perfil espectral semelhante ao padrão, ou seja, são da mesma classe química do padrão, foi realizada a análise espectral das soluções de trabalho (Curvas A e B), descritas no item 4.5.2 (Figuras 25 e 26). Estes perfis espectrais foram obtidos a partir do padrão fenólico escolhido de acordo com sua presença na espécie de *C. baccatum* e de uma amostra preparada a 50 µg/mL, para que os tempos de retenção e os espectros de UV dos mesmos pudessem ser comparados com as substâncias identificadas nas amostras.

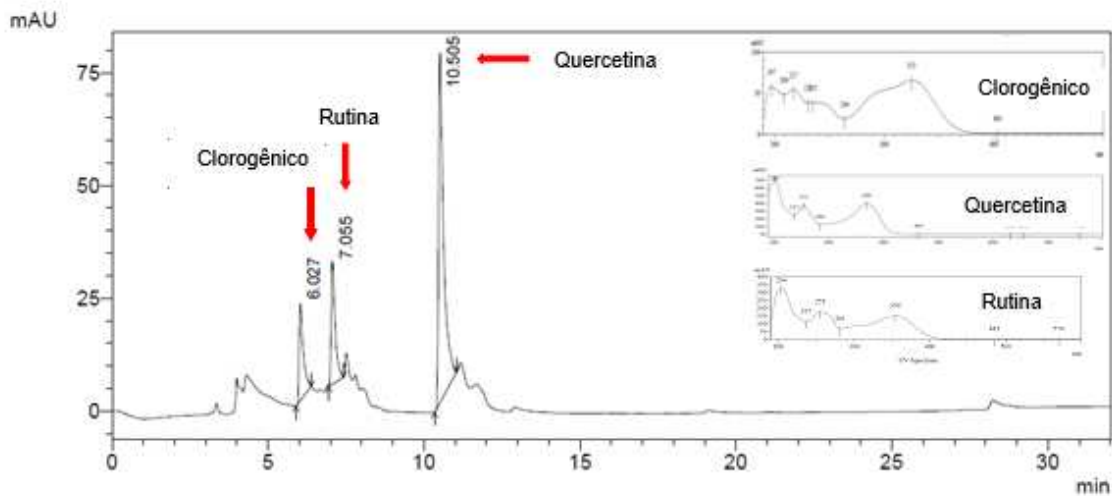


Figura 25. Cromatograma da Curva A – Soluções de trabalho mistas e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, rutina e quercetina.

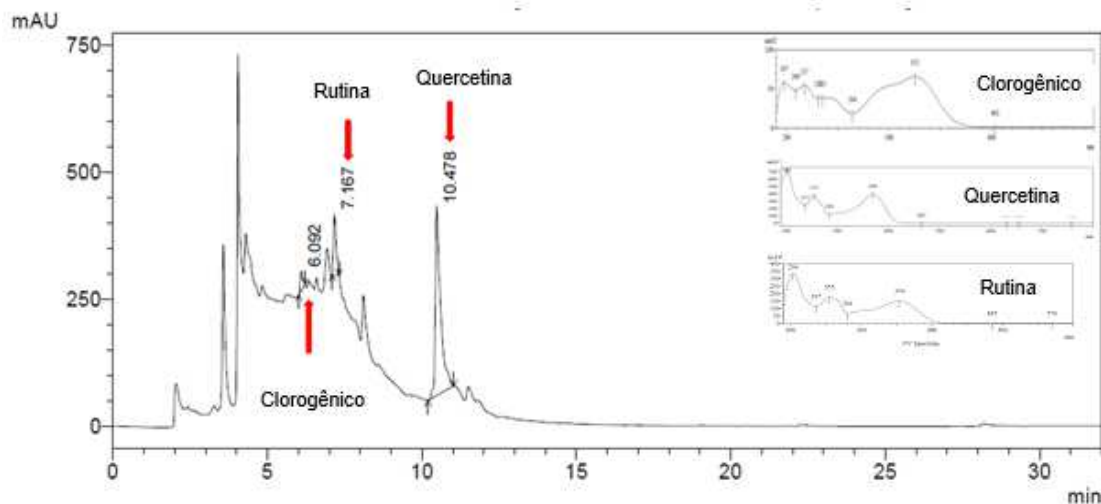


Figura 26. Cromatograma da Curva B – 500µl das soluções de trabalho mistas, diluídas com 500 µl da amostra e os respectivos espectros de UV do ácido clorogênico, rutina e quercetina.

Os espectros de absorção apresentados nas Figuras 25 e 26 demonstram o perfil de absorção da amostra e dos padrões ácido clorogênico, quercetina e rutina. Pode-se notar que a substância de interesse está presente na amostra, e que o perfil espectral da amostra corresponde ao perfil espectral dos padrões analisados, ambos absorvendo em 326 nm para o ácido clorogênico, e os flavonoides quercetina e rutina absorvendo em 250 e 350 nm, apontando a seletividade do método em quantificar, de fato, as substâncias de interesse.

Esses resultados corroboram com a seletividade do método no sentido de que não ocorreu co-eluição de produtos de degradação ou compostos constituintes da matriz no mesmo tempo de retenção do ácido clorogênico, e dos flavonoides quercetina e rutina, nas condições analisadas (Inmetro, 2003).

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A CLAE com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu nas substâncias analisadas, por permitir monitoração simultânea de vários compostos, além de fornecer o espectro de absorção característico do cromóforo e a pureza do pico.

Portanto, pode-se dizer que o método proposto é capaz de identificar o ácido fenólico e flavonoides no extrato obtido do acesso 1613 de pimentas *C. baccatum*, a partir das análises dos tempos de retenção e dos espectros de UV e em relação às coinjeções dos padrões puros em CLAE.

5.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica elaborada na concentração de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ pois esta foi a menor concentração possível para se determinar a integração da área do pico. Com os dados obtidos da equação da reta, calcularam-se o LD e o LQ, representados na Tabela 12.

Tabela 12. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de ácido clorogênico, quercetina e rutina, empregando CLAE- UV/ Vis.

	Detector UV/ Vis	
	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido clorogênico	0,81	2,45
Quercetina	1,79	5,45
Rutina	3,78	11,47

Os LD variaram entre $0,81$ e $3,78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de LD mais baixos foram obtidos para o ácido clorogênico ($0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de LD mais altos foram obtidos para a rutina e quercetina, com valores iguais a $3,78$ e $1,79 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Vale ressaltar, que os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado.

Os valores de LQ variaram entre $2,45$ e $11,47 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados mais elevados estão associados mais uma vez a rutina ($11,47 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($5,45 \mu\text{g mL}^{-1}$). O ácido clorogênico apresentou o menor valor de LQ ($2,45 \mu\text{g mL}^{-1}$).

De acordo com Simões e Schenkel (2002), os compostos fenólicos são instáveis e facilmente oxidáveis. Os derivados do ácido cinâmico, como, por exemplo, o ácido clorogênico, podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV. Esse fato, assim como o método extrativo aplicado e variações de genótipos, pode explicar a razão da baixa quantificação do ácido clorogênico no acesso analisado (Maillard e Berset, 1995). Santos e Blatt (1998) reforçam que variáveis como o clima, radiação solar, nutrição mineral, entre

outros, podem também interferir no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários como os flavonoides e ácidos fenólicos.

Os resultados elevados para os limites de detecção e quantificação observados para o flavonoide rutina (Tabela 12), corroboram no sentido de se verificar uma maior concentração desta substância no acesso 1613 de pimenta.

Semelhanças como esta também foram verificadas no trabalho de Bueno (2007), para o LD o valor encontrado foi de $4,79 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que para o LQ o valor obtido foi de $14,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial 1,8-cineol (Figura 27), visando contribuir para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus*.

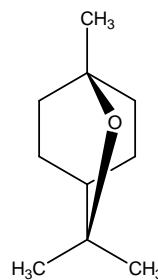


Figura 27. Estrutura química do 1,8-cineol.

Abad-García et al. (2007), descreveram um método para a determinação simultânea de várias famílias de polifenólicos em sucos de frutas. Os LD variaram entre $0,005$ e $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *p*-cumárico (Figura 28) e ácido elágico (Figura 29), respectivamente. Os LQ mostraram o método proposto suficientemente sensível para a determinação dos compostos fenólicos. Em trabalho desenvolvido por Canuto et al (2016), foi encontrado LD e LQ variando de 3 a 7 mol L^{-1} e 9 a 22 mol L^{-1} para a quantificação de antocianinas em morango (*Fragaria spp.*), classificadas como um subgrupo de flavonoides, uma classe onipresente de metabólitos secundários de plantas.

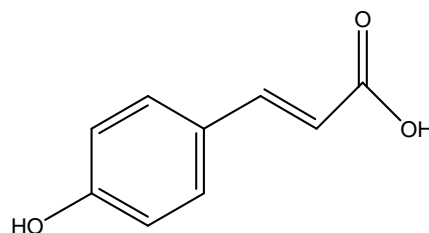


Figura 28. Estrutura química do *p*-cumárico.

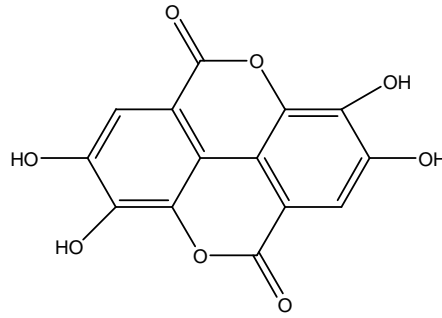


Figura 29. Estrutura química do ácido elágico.

Portanto, os resultados observados nesta pesquisa, demonstram que o método é sensível, permitindo a detecção de pequenas concentrações das substâncias fenólicas (ácido clorogênico, quercetina e rutina) presentes em amostras de pimentas.

Cabe ressaltar que este método fornece o resultado mais confiável para a dedução do LD e LQ, já que estes são estimativas do tamanho da amostra que pode ser detectada e quantificada com precisão (Ribani et al., 2004).

5.5. Precisão

A precisão foi considerada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária.

5.5.1 Repetitividade

Os resultados obtidos nos testes de repetitividade do método, foram expressos como DPR e podem ser visualizados nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13. Resultado da repetitividade da solução padrão de ácido clorogênico.

Concentração µg/mL	Repetição					Média	DP	DPR
	1	2	3	4	5			
2	1,94	1,82	2,54	2,51	2,45	2,25	0,34	0,15
10	9,69	9,60	9,34	9,67	9,26	9,51	0,19	0,02
50	51,88	51,50	52,91	53,22	52,57	52,41	0,71	0,01

DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 14. Resultado da repetitividade da solução padrão de quercetina.

Concentração µg/mL	Repetição					Média	DP	DPR
	1	2	3	4	5			
2	2,20	2,14	2,19	2,17	2,16	2,17	0,02	0,009
10	6,64	6,76	6,67	6,74	6,59	6,68	0,07	0,01
50	40,15	41,34	42,49	42,84	42,49	41,86	1,11	0,02

DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 15. Resultado da repetitividade da solução padrão de rutina.

Concentração µg/mL	Repetição					Média	DP	DPR
	1	2	3	4	5			
2	1,33	1,43	1,17	1,30	1,39	1,32	0,09	0,07
10	6,47	7,51	8,06	6,22	5,81	6,81	0,93	0,14
50	46,63	47,29	48,22	47,88	50,10	48,02	1,30	0,03

DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Constatou-se neste trabalho, em todos os testes realizados, que o método, apresentou baixos percentuais de DPR, isto é, inferior a 15% (Anvisa, 2003; ICH, 1995), indicando uma boa repetitividade.

A baixa precisão pode refletir a instabilidade e/ ou a degradação das soluções preparadas (incidência de luz, O₂ ou CO₂ a captura do ar, etc). Logo, o método proposto apresenta precisão suficiente para as substâncias fenólicas, capaz de proporcionar resultados próximos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (Anvisa, 2003; ICH, 1995).

É importante mencionar que produtos intermediários (extratos vegetais) são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como nos bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto a composição das matrizes biológicas. Desta forma, o DPR deve ser menor ou igual a 15% para aceitar uma curva de calibração, enquanto que para os métodos analíticos se aceita no máximo 5%. Portanto, quanto mais próximos entre si estiverem os valores experimentais (menor amplitude), mais preciso será o método. Esta

medida reflete a tendência de maior ou menor afastamento (erro) entre os resultados dos ensaios (Anvisa, 2003).

5.5.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em três dias diferentes e por analistas diferentes, utilizando-se o mesmo equipamento CLAE. Para o 1° dia, utilizaram-se os resultados do teste de repetibilidade para o analista 1.

Os resultados encontrados com este parâmetro estão dispostos nas Tabelas 16, 17 e 18 (ácido clorogênico); 19, 20 e 21 (quercetina); 22, 23 e 24 (rutina). O tratamento estatístico realizado pelo teste *t*-Student apontou diferença entre as médias obtidas, e entre os analistas no primeiro, segundo e terceiro dia, assim como, entre o mesmo analista nos diferentes dias.

Os valores obtidos comprovam a precisão do método desenvolvido tanto em nível de repetibilidade quanto em nível de precisão intermediária, uma vez que se apresentaram dentro dos limites de aceitação, ou seja, o DPR entre os resultados das replicatas realizadas foi inferior a 15%, conforme especificação da Anvisa (Anvisa, 2003; ICH, 1995).

Ácido Clorogênico

Tabela 16. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	1.94	1.82	2.54	2.51	2.45	2.25 a	0.34	0.15
Analista 2	2° dia	2.37	2.06	1.93	2.28	2.35	2.19 a	0.19	0.09
Analista 3	3° dia	2.18	2.02	2.33	2.27	2.24	2.20 a	0.11	0.05

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 17. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)				
--	--	--	--	--	--	--

	1	2	3	4	5	Média	DP	DPR
Analista 1 1° dia	9.69	9.60	9.34	9.67	9.26	9.51 a	0.19	0.02
Analista 2 2° dia	9.36	8.73	8.50	8.40	9.09	8.81 b	0.40	0.04
Analista 3 3° dia	7.81	7.81	7.75	7.82	7.76	7.79 c	0.03	0,004

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 18. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de ácido clorogênico ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

	Repetição ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
	1	2	3	4	5			
Analista 1 1° dia	51.88	51.50	52.91	53.22	52.57	52.41 a	0.71	0.01
Analista 2 2° dia	49.41	48.78	51.37	47.97	52.89	50.08 b	2.00	0.04
Analista 3 3° dia	47.58	49.56	48.00	47.05	49.18	48.27 b	1.06	0.02

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Comparando-se os resultados obtidos para a precisão intermediária do ácido clorogênico, verifica-se maiores valores de DPR na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, porém não houve diferenças significativas para a menor concentração ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) entre os diferentes analistas e dias. Observaram-se diferenças significativas na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os três analistas nos diferentes dias. E na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ apenas o analista 1 diferiu estatisticamente dos analistas 2 e 3 em nível de 5% de significância.

Quercetina

Tabela 19. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

	Repetição ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
	1	2	3	4	5			

Analista 1	1° dia	2.20	2.14	2.19	2.17	2.16	2.17 a	0.02	0,009
Analista 2	2° dia	2.11	2.29	2.16	2.12	2.16	2.16 a	0.07	0.03
Analista 3	3° dia	2.25	2.06	2.21	2.09	2.22	2.16 a	0.08	0.04

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 20. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	6.64	6.76	6.67	6.74	6.59	6.68 a	0.07	0.01
Analista 2	2° dia	6.66	6.42	5.89	6.25	6.66	6.37 b	0.32	0.05
Analista 3	3° dia	6.65	5.61	5.84	6.34	5.75	6.03 c	0.43	0.07

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 21. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de quercetina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	40.15	41.34	42.49	42.84	42.49	41.86 a	1.11	0.03
Analista 2	2° dia	41.06	44.65	40.51	41.56	39.01	41.35 a	2.07	0.05
Analista 3	3° dia	40.49	41.49	39.53	37.52	40.46	39.89 a	1.49	0.04

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).
DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Considerando-se a precisão intermediária da quercetina, DPR abaixo de 15% foi encontrado para todas as concentrações (2, 10 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Pôde ser observado na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que houve diferença significativa entre os diferentes analistas e dias. Enquanto para as demais concentrações (2 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), não houve diferença significativa entre os analistas, e nem entre os dias em nível de 5% de significância.

Rutina

Tabela 22. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	1.33	1.43	1.17	1.30	1.32	1.32 a	0.09	0.07
Analista 2	2° dia	1.72	1.48	1.59	1.50	1.19	1.49 a	0.19	0.13
Analista 3	3° dia	1.51	0.86	2.08	1.61	1.78	1.56 a	0.45	0.29

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 23. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	6.47	7.51	8.06	6.22	5.81	6.81 b	0.93	0.14
Analista 2	2° dia	8.23	7.75	7.22	8.06	8.57	7.96 a	0.51	0.06
Analista 3	3° dia	5.62	5.40	5.87	5.75	6.72	5.87 c	0.50	0.08

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Tabela 24. Resultado da precisão intermediária para a solução padrão de rutina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

		Repetição ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)					Média	DP	DPR
		1	2	3	4	5			
Analista 1	1° dia	46.63	47.29	48.22	47.88	50.10	48.02 a	1.30	0.03
Analista 2	2° dia	48.04	41.79	45.72	44.88	43.54	44.79 a	2.34	0.05
Analista 3	3° dia	42.47	42.41	41.48	49.95	52.67	45.71 a	5.20	0.11

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). DP= desvio padrão; DPR= desvio padrão relativo.

Resultados semelhantes foram obtidos na precisão intermediária da rutina. Observou-se se que na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ houve diferença significativa entre os diferentes analistas e dias. Enquanto, nas demais concentrações (2 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), não houve diferença significativa entre os analistas, e nem entre os dias em nível de 5% de significância.

5.6. Exatidão

Geralmente, os métodos de análise envolvem a transferência do analito de matrizes complexas para soluções mais simples, possibilitando, assim, a determinação instrumental. No entanto, este procedimento resulta, na maioria das vezes, em perda do analito ou em retenção de porções deste na própria matriz depois da extração, levando a uma quantificação errônea (Thompson et al., 1999). Diante do exposto, a recuperação do método deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a substância de interesse, o que pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (Ribani et al., 2004).

Na tabela 25, constam os dados obtidos por CLAE para os testes de recuperação da amostra de pimenta (acesso 1613), expressos em termos de porcentagem de recuperação.

Tabela 25. Resultados dos testes de recuperação de substâncias fenólicas em acesso 1613 de pimenta.

	Ácido clorogênico				Quercetina				Rutina			
	C ₁	C ₃	C ₂	%R	C ₁	C ₃	C ₂	%R	C ₁	C ₃	C ₂	%R
Pimenta	0,54	1,0	1,34	80	3,9	4,0	7,14	81	28,85	25,0	49,35	82
(Acesso 1613)	0,54	1,5	1,69	77	3,9	6,0	8,40	75	28,85	35,0	59,30	87
	0,54	2,0	2,40	93	3,9	8,0	11,2	92	28,85	50,0	69,85	82

C₁= Concentração determinada na amostra não adicionada. C₂= Concentração determinada na amostra adicionada. C₃= Concentração adicionada. %R= % Recuperação.

Observou-se neste estudo, que a recuperação para as substâncias fenólicas de interesse, foi na faixa de 75 a 93%. Os resultados se encontram dentro da faixa aceitável de recuperação, porém porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% é o desejável, mas, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata conforme a RE 899, 2003.

Para trabalhos que utilizaram extrato seco de *Passiflora Incarnata L.*, a média das recuperações da exatidão foi de 97,83% dentro da faixa aceitável de recuperação (Ziliotto et al., 2012). Entretanto, Chabariberi (2009) mostrou que os flavonoides de *P. incarnata L.* e Passifloraceae, por espectrometria UV-Visível, tiveram valores de recuperação entre 70 e 120%, encontrando-se aceitáveis segundo os limites propostos (ICH, 1995).

Na validação de um método por Cromatografia Líquida para quantificar antocianinas em morango (*Fragaria spp.*), foram obtidas recuperações de 83 a 99%. Esses valores são considerados aceitáveis para a matriz estudada, devido à sua complexidade, segundo a AOAC (80-120% para alimentos) (AOAC, 2012).

Recuperações de 98-100% foram obtidas para flavan-3-óis, e ácidos hidroxibenzoicos hidroxicinâmicos, dihidrocalcones, flavonóis e flavonas, ao passo que as recuperações menores de 83% foram observadas para as flavanonas, o que foi atribuído às suas estruturas polares de baixo peso molecular. Estas substâncias menos polares tendem a ser mais solúveis em solventes não aquosos. Contudo, o método foi adequado para todas as classes de fenólicos presentes em frutas, exceto para flavanonas, baseada na Cromatografia Líquida

para a determinação simultânea de várias famílias polifenólicas em sucos de frutas (Abad-García et al., 2007).

Considerando a ausência de materiais de referência e a falta de métodos oficiais de análise de compostos fenólicos, a tarefa de medição de recuperação se torna difícil. Da mesma forma, que a extração completa de compostos fenólicos de paredes de células não é fácil e, subseqüentemente, não muita informação referente à extração completa de compostos fenólicos pode ser encontrada na literatura. Para o ácido clorogênico, a quercetina e a rutina não se encontrou na literatura informação de recuperação para metodologia por CLAE- UV.

5.7. Robustez

A robustez do método foi comprovada alterando condições de análises como fluxo e temperatura do forno, conforme dados apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Variações nas condições cromatográficas na quantificação de substâncias fenólicas por CLAE.

Fluxo	Ácido clorogênico		Quercetina		Rutina	
	Temperatura		Temperatura		Temperatura	
	30°C	40°C	30°C	40°C	30°C	40°C
0,8 mL min ⁻¹	22,08 bA	31,19 aA	27,78 aA	27,52 aA	30,19 aA	32,78 aA
1,2 mL min ⁻¹	23,48 bA	32,53 aA	18,57 aB	18,77 aB	29,65 aA	28,09 aA
CV (%)	3,08		1,22		9,62	

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p = 0,05). CV= Coeficiente de Variação.

As análises de robustez mostraram que pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, tais como a variação na velocidade de fluxo e temperatura do forno, não resultaram em problemas na quantificação da rutina, confirmando a robustez do método proposto. Porém, observam-se variações dos resultados obtidos com as soluções analisadas (ácido clorogênico e quercetina) nas condições usuais descritas no método, causando interferência significativa nos resultados.

Neste estudo, verifica-se para o ácido clorogênico, comparando-se tanto o fator velocidade de fluxo 0,8 mL min⁻¹, quanto o de 1,2 mL min⁻¹, que a variação na temperatura influenciou na concentração das amostras, tornando-as

estatisticamente diferentes entre si. Mas, a alteração do volume dos fluxos não interferiu estatisticamente na concentração das amostras.

Quanto à quercetina, tanto o fator temperatura 30°C como a temperatura 40°C analisadas isoladamente, a alteração na velocidade do fluxo (0,8mL min⁻¹ e 1,2 mL min⁻¹) interferiu na concentração da amostra, tornando-as estatisticamente diferentes entre si. Porém, a alteração da temperatura dentro do mesmo fluxo não interferiu na concentração da amostra.

Sabe-se que o controle da temperatura em Cromatografia Líquida, influencia fortemente parâmetros como solubilidade, polaridade e viscosidade da fase móvel. Recentemente tem aumentado o número de trabalhos publicados a respeito do potencial de melhorar a resolução cromatográfica, através de um aumento na seletividade ou na eficiência, fatores dependentes da temperatura, especialmente sistemas baseados em fase inversa (Teutenberg, 2009; Zhun e Wren, 2005).

Finalmente, observando-se as concentrações das substâncias fenólicas obtidas em cada conjunto de modificações, nota-se que a velocidade de fluxo e a temperatura do forno influenciaram nos resultados. De fato, o pior resultado foi obtido para o ácido clorogênico e quercetina. Por esse motivo é importante que as condições analíticas estabelecidas, tais como fluxo e a temperatura do forno, sejam monitoradas e respeitadas, para que ocorra com sucesso a quantificação desejada. Cabe mencionar, que ainda, não foram encontradas correlações entre as concentrações destas substâncias fenólicas e a temperatura do forno e velocidade de fluxo.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A execução deste trabalho permitiu alcançar com sucesso o objetivo principal, validar um método bioanalítico, capaz de demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, principalmente no que tange ao controle de qualidade e validação de métodos para análise de extratos vegetais.

Desta forma, foi validado um método utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), por permitir monitoração simultânea de várias substâncias, além de fornecer o espectro de absorção característico do cromóforo e a pureza do pico, para a identificação das substâncias fenólicas (ácido clorogênico, flavonoides quercetina e rutina), presentes no acesso 1613 de *Capsicum baccatum*.

Conforme a RE 899 de 2003, em caso de métodos bioanalíticos, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada somente se atender aos parâmetros de linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Os parâmetros avaliados mostraram os seguintes resultados:

- a) A linearidade dos padrões ácido clorogênico, quercetina e rutina apresentou coeficientes de correlação (r^2) iguais a 0,993; 0,998 e 0,993, respectivamente, superior ao especificado 0,98 para extratos vegetais;
- b) A seletividade do método foi satisfatória apenas para a quantificação do ácido clorogênico no extrato de *C. baccatum*. Embora, tenha observado correspondência entre os tempos de retenção do ácido clorogênico, quercetina e rutina, nas análises espectrais, confirmando a seletividade do método em quantificar, de fato, as substâncias de interesse;
- c) Os valores de LD mais baixos foram obtidos para o ácido clorogênico ($0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de LD mais altos foram obtidos para a rutina e quercetina, com valores iguais a 3,78 e $1,79 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os valores de LQ mais elevados estão associados

mais uma vez a rutina ($11,47 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($5,45 \mu\text{g mL}^{-1}$). O ácido clorogênico apresentou o menor valor de LQ ($2,45 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados de LD foram sempre menores que os valores de LQ, como era esperado;

- d) Os valores de desvio padrão relativo, obtidos tanto para precisão, nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária, não excederam o máximo de 15% estipulado nos critérios de aceitação, considerando a complexidade da matéria-prima vegetal;
- e) As amostras de pimenta na exatidão apresentaram valores menores de recuperação na faixa de 75 a 93%. Porcentagens de recuperação do analito próximas a 100% é o desejável, mas, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata;
- f) No teste de robustez, as variações de resultados obtidos com as variáveis das análises não causaram interferência significativa nos resultados da rotina. Verificou-se interferência significativa nos resultados do ácido clorogênico e quercetina, nas condições usuais descritas no método.

Com base nestes resultados e considerando que a CLAE tem sido a técnica mais empregada pela simplicidade, rapidez e estabilidade do método, se pode concluir que a metodologia apresentada atende aos requisitos mínimos de validação, exceto para o parâmetro de robustez, em especial para o ácido clorogênico e quercetina. O método de determinação de substâncias fenólicas por CLAE em extratos de *Capsicum baccatum* mostrou aplicabilidade ao uso pretendido para o flavonoide rutina.

Também é importante ressaltar que na literatura são escassos trabalhos relacionados à validação de metodologia por CLAE- DAD que investiguem a fundo a presença destas substâncias fenólicas em frutos das espécies deste gênero. Portanto, a necessidade de conhecimentos mais específicos e aplicados a fim de contribuir para a área da ciência e tecnologia de alimentos é essencial, em função dos excelentes atributos nutricionais e organolépticos das pimentas, e a promoção de benefícios à saúde, devido os frutos de pimentas serem fontes importantes de antioxidantes naturais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-GARCÍA, B., BERRUETA, L. A., LÓPEZ- MÁRQUEZ, D. M., CRESPO-FERRER, I., GALLO, B., VICENTE, F. (2007) Otimização e validação de uma metodologia baseada na extração de solvente e cromatografia líquida para a determinação simultânea de várias famílias polifenólicos em sucos de frutas. *Journal of Chromatography A*, 1154 (1-2): 87-96.

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant science*, 196: 67-76.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2003). *Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003*. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de Junho de 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2013). *RDC no 58, de 20 de dezembro de 2013*. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 dez. 2013.

ALBRECHT, E., ZHANG, D., MAYS, A. D., SAFTNER, R. A., STOMMEL, J. R. (2012b) Genetic diversity in *Capsicum baccatum* is significantly influenced by its ecogeographical distribution. *BMC Genetics*, 13:1-15.

ALBRECHT, E., ZHANG, D., SAFTNER, R. A., STOMMEL, J. R. (2012a) Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. *Genet Resour Crop Evol*, 59:517-538.

AMARAL, K. A. S., MACHINSKI J. R. M. (2006) Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista Analytica*, 24: 60-62.

ANDRADE, J. B. (2009) Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, 32 (9): 2476- 2481.

ANDRADE, J. C. (1987) O papel dos erros determinados em análises químicas. *Química Nova*, 10 (3): 159- 251.

ANGELO, P. M., JORGE, N. (2007) Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*, 661 (1): 232-240.

ANTONIOUS, G. F., KOCHHAR, T. S., JARRET, R. L., SNYDER, J. C. (2006) Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *Journal of Environmental Science and Health*. 41 (7): 1237-1243.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) INTERNATIONAL (2012). Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. Disponível em <<http://www.aoac.org>>. Acesso: em 29 maio de 2015.

AQUINO-NETO, F. R., SOUSA NUNES, D. S. (2003) *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro.

ARORA, R., GILL, N. S., CHAUHAN, G., RANA, A. C. (2011) An overview about versatile molecule capsaicin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3 (4): 280-286.

ASSIS, M. L. V. (2014) Determinação do Potencial Antioxidante e Quantificação de Compostos Fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Dissertação de Mestrado – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 139 p.

Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas - GARP (1999) *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos* (apostila).

BAE, H., JAYAPRAKASHA, G. K., JIFON, J., PATIL, B. S. (2012) Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Journal Food Chemistry*, 130: 751-758.

BARROS NETO, B., PIMENTEL, M. F., ARAÚJO, M. C. U. (2002) Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, 25 (5): 856-865.

BASU, S. K.; DE, A. K (2003) *Capsicum*: historical and botanical perspectives. In: De AK (Ed) *Capsicum: The genus Capsicum*. Taylor & Francis, London & New York, 1-15.

BERTOLDI, M. C. (2006) Atividade antioxidante in vitro da fração fenólica, das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, 96 p.

BOGUSZ, J. S., TAVARES, A. M., TEIXEIRA, F. J., ZINI, C. A., GODOY, H. T. (2012) Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum spp.*) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International*, 48: 98–107.

BOSLAND P. W., VOTAVA E. J. (2000) Peppers: vegetable and spice capsicum. Wallingford: CABI. 204p.

BOSLAND, P., VOTAVA, E. (2012). Peppers: vegetable and spice capsicums, 2nd ed. Cabi, Wallingford, UK. 230p.

BOUE, S. M., CARTER-WIENTJIES, C. H., SHIH, B. Y., CLEVELAND, T. E. (2003) Identification of flavones aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 991: 61–68.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. (1995) USE OF A FREE RADICAL method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.

BRUGGINK, C. (2000) Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography. Conference proceeding AVH Association - 7 th Symposium; Reims, 3-9.

BUENO, P. C. P. B. (2007) Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto. Dissertação de Mestrado - Ribeirão Preto - SP, Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP, 102 p.

BURNS, D. T., DANZER, K., TOWNSHEND, A. (2002) *Pure Appl. Chem.*, 74, 2201.

CANUTO, G. A. B., OLIVEIRA, D. R., CONCEIÇÃO, L. S. M., FARAH, J. P. S. F., TAVARES, M. F. M. (2016) Desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de antocianinas em morango (*Fragaria spp.*) e estudos complementares sobre a estabilidade, cinética e poder antioxidante. *Food Chemistry*, 192: 566-574.

CARDOSO, N. Q. (2013) Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir de *Lafoensia pacari* A. St. - Hill (Lythraceae). Dissertação de Mestrado - Goiânia – GO, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 93 p.

CARLOS, E. A., NEVES, A. A., REIS, C., QUEIROZ, M. E. L. R. (2011) Determinação simultânea de triazolmetanos e agrotóxicos em água por cromatografia gasosa. *Quimica Nova*, 34 (2): 272-278.

CARPES, S. T. (2008) Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil. Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba, 255 p.

CARVALHO, S. I. C., BIANCHETTI, L. B. (2004) Sistema de produção de pimentas. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>>. Acesso: em março de 2015.

CARVALHO, S. I. C., BIANCHETTI, L. B., RIBEIRO, C. S. C., LOPES, C. A. (2006) Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças. Documento, 94: 27 p.

CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G. (2001) Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação. São Caros: EdUFSCar. 77 p.

CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. (2009) Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32 (4): 1021- 1030.

CASTRO, S. M., SARAIVA, J. A., DOMINGUES, F. M. J., DELGADILLO, I. (2011). Effect of mild pressure treatments and thermal blanching on yellow bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *LWT- Food Science and Technology*, 44(2), 363–369.

CHABARIBERI, R. A. O., POZZI, A. C. S., ZERAIK, M. L., YARIWAKE, J. H. (2009). Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19 (4): 860 – 864.

CHUI, Q. S. H., ZUCCHINI, R. R., LICHTIG, J. (2001) Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Química Nova*, 24: 374-380.

CIOLA, R. (1998) Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC. 1º ed., Edgard Blucher Ltda, São Paulo. 179 p.

CLAVIN, M., GORZALCZANY, S., MACHO, A., MUÑOZ, E., FERRARO, G., ACEVEDO, C., MARTINO, V. (2007). Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 585-589.

COLLINS, C. H., GUIMARÃES, L. F. L. (1988) Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 179 – 243.

COLLINS, C. H. (1997) Princípios de Cromatografia. In: UNICAMP (Ed.) Introdução a métodos cromatográficos. 7. Campinas, 11-27.

COLLINS, C. H. (2006) Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. Carta ao Editor. *Química Nova*, 9 (4): 889-890.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (2006) Fundamentos de Cromatografia, 1ª ed., Editora Unicamp: Campinas. 452 p.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. (1987) Princípios básicos de cromatografia. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Ed. UNICAMP, p. 13-17.

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA – CRQ (2010). Conceitos fundamentais de Cromatografia líquida de Alto Desempenho (HPLC). Disponível em: http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf Acesso: em janeiro de 2015.

COSTA, L. M., MOURA, N. F., MARANGON, C., MENDES, C. E., TEIXEIRA, A. O. (2009) Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

COSTA, R. C. C. (2005) Metodologias analíticas para o controle de produtos farmacêuticos. *Química*, v.99, p.53 – 56. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_099_05309.pdf>. Acesso: em março de 2015.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. G. (2009) Natural Products (Secondary Metabolites). In: Burchman, B. B.; Grisse, W.; Jones, R. L. *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.

CUSTODIO, R., DE ANDRADE, J. C., AUGUSTO, F. (1997) O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Química Nova*, 20 (2): 219 - 225.

DANI, C., AGINONI, J. C., CALLONI, C., SALVADOR, M., SPADA, P. D. S. (2010) Viabilidade celular de cultura de linfócitos tratados com *Annona muricata* L. *Ciência em Movimento*. 12 (24): 95 - 101.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. (2004) Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5 (1): 33-40.

DI CAGNO, R., SURICO, R. F., MINERVINI, G., DE ANGELIS, M., RIZZELLO, C. G., GOBBETTI, M. (2009) Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers *Capsicum annum* L. to be stores at room temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 108-116.

DUTRA, A. S., FURTADO, A. A. L., DELIZA, R., FERREIRA, J. C. S. (2007) Cinética da degradação da textura de pimentas em conserva. B.CEPPA, Curitiba, 25 (2):267-274.

DUTRA, F. L. G., RIBANI, R. H. (2010) Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-mate. *Química Nova*, 33 (1): 119-123.

EDGE, R., MCGARVEY, D. J., TRUSCOTT, T. G., (1997) The carotenoids as antioxidants – a review. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 41, 189-200.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) (2015) Embrapa Hortaliças – Pimenta (*Capsicum spp*). Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html. Acesso: em fevereiro de 2015.

EMER, J. E., MILLER, J. H. M. (2005) Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.

ESCARPA, A., GONZALEZ, M. C. (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31: 57-139.

FERNANDEZ-PANCHON M. S., VILLANO D., TRONCOSO A. M., GARCIA-PARRILLA M. C. (2011) Antioxidante activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, 48 (7): 649-671.

FRIEDRICH, R. B., RAVANELLO, A., CICHOTA, L. C., ROLIM, C. M. B., BECK, R. C. R. (2009) *Quimica Nova*, 32: 1052

GIL, E. S. (2010) Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos, 3ª ed., LMC-Pharmabooks Ed.: São Paulo. 512 p.

GIUFFRIDA, D., DUGO, P., TORRE, G., BIGNARDI, C., CAVAZZA, A., CORRADINI C., DUGO, G. (2013) Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*, Barking, 140: 794-802.

GOMES, S. M. C. (2010) Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica. Tese de Mestrado em Química de Controle de Qualidade e Ambiente – Coimbra, Universidade de Coimbra. 54 p.

GONÇALVES, T. M. (2005) Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 97 p.

GREEN, J. M. (1996) A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, 68 (9): 305 – 309. Disponível em: <<http://acsinfo.acs.org/hotartcl/ac/96/may/may.html>>. Acesso: em novembro de 2015.

GUILHARME, D., VEUTHEY, J. L. (2013) State-of-the art of (UHP) LC–MS (–MS) techniques and their practical application. *Journal of Chromatography A*, 1292: 1.

GUIMARÃES, E. C. B. T., RODRIGUES, C. R., DIAS, L. R. S., DORNELLAS, C. B., CASTRO H. C., CABRAL, L. M., SANTOS, T. C. (2007) Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para o Controle Químico da Qualidade de Fitoterápicos à Base de Extrato Seco de Alcachofra. *Revista Fitos*, 3 (02): 64- 77.

GUIOCHON, G., GRITTI, F. (2011) Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *Journal of Chromatography A*, 1218: 1915-1938.

GUZMAN, I., HAMBY, S., ROMERO, J., BOSLAND, P. W., OCONNELL, M. A. (2010) Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science*, 179: 49-59.

HAIDA, K. S., BARON, Â., HAIDA, K. S., FACI, D., HAAS, J., SILVA, F. J. (2011) Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de Goiaba e Arruda. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 9 (28): 11-19.

HARBORNE, J. B. (1989) General procedures and measurement of total phenolics. In: Dey, P. M.; Harborne, J. B. *Methods plant biochemistry*, v.1: pant phenolics. (ed). London: Academic press.

HARBORNE, J. B. (1994). *The Flavonoids - Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, 703 p.

HUBER, L. (1998) Validation of analytical methods: review and strategy. *LC-GC International*, 11: 96-105.

HUDAIB, M., SPERONI, E., PIETRA, A.M.D., CAVRINI, V. (2002) CG/EM Evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the

vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29: 691–700.

HUSAIN, S. R., CILLARD, J., CILLARD, P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26: 2489-2491.

IBRAHIM, B., SOWEMIMO, A., VAN ROOYEN, A., VAN DE VENTER, M., (2012) Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, p. 282-289.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH (1995). Validation of Analytical Procedures: Definitions and Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Guideline Q2B* - Genebra, Suíça.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Guideline Q2 (R1)* - Genebra, Suíça.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO (2000). *Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia*, 2ª ed.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO (2003). *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, DOQ-CGCRE-008.

JARRET, R. J. (2007) Morphologic variation for fruit characteristics in the USDA/ARS *Capsicum baccatum* L. germplasm collection. *HortScience*, 42(5):1303-1305.

JENKE, D. R. (1998) Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. *Instrument. Sci. Technol.* 26 (1).

JICKELLS, S., NEGRUSZ, A. (2008) *Clark's Analytical Forensic Toxicology*. Cambridge: Pharmaceutical Press.

KAPPEL, V. D., COSTA, G. M., SCOLA, G., SILVA, F. A., LANDELL, M. F., VALENTE, P., SOUZA, D. G., VANZ, D. C., REGINATTO, F. H., MOREIRA, J. C. (2008) Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *Journal of Medicinal Food*, 11 (2): 267–274.

KING, B (2003) In-house method validation. A guide for chemical laboratories. LGC Limited. Disponível em: <<http://www.nmschembio.org.uk/PublicationArticle.aspx?m=115&amid=1532>>. Acesso: em março de 2015.

KLEIN, T., LONGHINI, R., BRUSCHI, M.L., MELLO, J.C.P. (2009) Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30 (3): 241-248.

KOLLMANNSBERGER, H., RODRIGUEZ-BURRUEZO, A., NITZ, S., NUEZ, F. (2011) Volatile and capsaicinoid composition of aji (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:1598–1611.

KOO, H. M., SUHAILA, M. (2001) Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chemistry*, 49 (6): 3106-3112.

LANÇAS, F. M. (2004). *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. São Carlos: RiMa. p.62.

LÁZARO DE LA TORRE, C. A. (2013) Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de amins biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves. Niteroi, 2013. Tese de Doutorado – Niteroi – RJ, Universidade Federal Fluminense, 147p.

LEWANDROWSKI, K. (2002) Chromatography and Capillary Electrophoresis. In: Clinical Chemistry, Laboratory Management & Clinical Correlations. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 976 p.

LIANDA, R. L. P. (2009) Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Tese de Doutorado em Química dos Produtos Naturais - Seropédica, Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

LISA, M. S., RAHMAN, R. A., MANDANA, B., JINAP, S., RAHMAT, A., ZAIDUL, I.S.M., HAMID, A. (2010) Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoids from *Strobilanthes crispus* (pecah Kaca). *Food and Bioprocess Processing*, 88: 319–326.

LÓPEZ, P., GORZALCZANY S., ACEVEDO C., ALONSO R., FERRARO G. (2012) Chemical study and antiinflammatory activity of *Capsicum chacoense* and *C. baccatum*. *Revista brasileira de farmacognosia*, 22 (2): 455-458.

LOWEN, T. C. R. (2003) Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de Lamivudina e do Ensaio Limite do Enantiômero (+) BCH-189 em Comprimidos de Lamivudina. Dissertação de Mestrado – RJ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, 105 páginas.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B. (1970) Systematic identification of flavonoids. New York (USA): Springer-Verlag, 354.

MAILLARD, M. N., BERSET, C. (1995) Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (7): 1789-1793.

MAJORS, R. E. (2005) Fast and ultrafast HPLC on sub-2- μm porous particles - where do we go from here? *LCGC North America*, 23 (12): 1248-1255.

MARIUTTI, L. R. B., BRAGAGNOLO, N. (2007) Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae: Aplicação em Produtos Alimentícios. *Brazilian Journal of food Technology*, 10: 96-103.

MARKHAN, K. R. (1989) *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 113.

MECKELMANN, S. W., RIEGEL, D. W., ZONNEVELD, M. J., RÍOS, L., PEÑA, K., UGAS, R., QUINONEZ, L., MUELLER-SEITZ, E., PETZ, M. (2013) Compositional characterization of native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (10): 2530- 2537.

MEGHVANSI, M. K., SIDDIQUI, S., KHAN, M. H., GUPTA, V. K., VAIRALE, M. G., GOGOI, H. K., SINGH, L. (2010). Naga chilli: a potential source of capsaicinoids with broadspectrum ethnopharmacological applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 1–14.

MELO, E. A., MACIEL, M. I. S., LIMA, V. L. A. G., ARAÚJO, C. R. (2008) Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. *Alim. Nutr.*, Araraquara,19 (1): 67-72.

MELO, P. S. (2010) Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 100 p.

MORAES, L. P., PAZ, M. F., ARGANDONA, E. J. S., SILVA, L. R., ZAGO, T. O. (2012) Phenolic compounds and antioxidant activity of fermented “dedo-de-moça”. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, Londrina, 1 (2): 33-38.

MORAES, M. O. B. (2013) Caracterização química e determinação da atividade antioxidante em massa da graviola (*Annona muricata* L.). Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB - Itapetinga-BA – 61 p.

MOREIRA, A. V. B., MANCINI-FILHO, J. (2004) Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. *Revista de Nutrição*, Campinas, 17 (4): 411 – 424.

NASCIMENTO, E. A., CHANG, R., MORAIS, S.A. L., PILÓ-VELOSO, D., REIS, D. C. (2008) Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Rev Bras Farmacogn*, 18: 379-383.

NASCIMENTO, T. G. (2004) Desenvolvimento e Validação de Métodos Bioanalíticos para quantificação simultânea de fármacos em plasma humano. Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, 254p.

NEITZKE, R. (2012) Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* – explorando a multiplicidade de usos. Tese de Doutorado em Agronomia - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 115p.

NIJVELDT, R. J., NOOD E., HOORN D. E., BOELEN P. G., NORREN, K., LEEUWEN P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J. Clin. Nutr.*, 74 (4): 418-425.

NÚÑEZ-RAMÍREZ, F., GONZÁLEZ-MENDOZA, D., GRIMALDO-JUÁREZ, O., DÍAZ, L. C. (2011) Nitrogen fertilization effect on antioxidants compounds in fruits of habanero chili pepper (*Capsicum chinense*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 13 (5): 827-830.

O'PREY, J., BROWN, J., FLEMING, J., HARRISON, P. R. (2003) Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 66: 2075–2088.

OBOH, G., ROCHA, J. B. T. (2007) Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and unripe tree pepper (*Capsicum pubescens*). *Journal of Food Biochemistry*, Hoboken, 31 (4): 456-473.

OLDONI, T. L. C. (2010) Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais. Tese de Doutorado em Ciências – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 163p.

OLIVEIRA, A. C., VALENTIN, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. (2009) Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*, 32 (3): 689 – 702.

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

OYAGBEMI, A. A., SABA, A. B., AZEEZ, O. I. (2010) Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian J. Cancer*, 47: 53-58.

PAULA, I. C. (2004) Proposta de um método em execução do processo de desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Tese de Doutorado em Engenharia de Produção - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 245 p.

PELZER, L. E., GUARDIA, T., JUAREZ, A. O., GUERREIRO, E. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. *II Farmaco* 53: 421-424.

PEREIRA, A., SCHESHOWITSCH, K., CRUZ, A., SILVA, M., STULZER, H. K. (2007) Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrofotometria ultravioleta (UV). *Visão Acadêmica*, 8: 29-37.

PINO, J., GONZALEZ, M., CEBALLOS, L., CENTURION-YAH, A. R., TRUJILLO-AGUIRRE, J., LATOURNERIE-MORENO, L., SAURI-DUCH, E. (2007) Characterization of total capsainoids, colour and volatile compounds of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* jack) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry*, 104: 1682-16.

PINTO, C. M. F., PINTO, C. L. O., DONZELES, S. M. L. (2013) Pimenta *capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, Viçosa, 3 (2): 108-120.

PLOCHMANN, K., KORTE, G., KOUTSILIERI, E., RICHLING, E., RIEDERER, P., RETHWILM, A., SCHREIER, P., SCHELLER, C. (2007) Structure–activity relationships of flavonoids induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460: 1–9.

PORTE, A., GODOY, R. L. O. (2008) Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Journal of the Serbian Chemical Society*. 73 (3): 307-310.

PORTO, H. S. M (2014) HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. Dissertação de Mestrado – Coimbra – Portugal, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 118 p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (2000) *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. *Embrapa Hortaliças*, 113 p.

REIS, C. N. (2011) *Annona muricata* L.: análise química e biológica dos frutos de gravioleira. Dissertação de Mestrado – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 149 p.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780.

RIBEIRO, C. S. C., LOPES, C. A., CARVALHO, S. I. C., HENZ, G. P., REIFSCHNEIDER, F. J. B. (2008) Pimentas *Capsicum*, Brasília: *Embrapa Hortaliças*. 153 p.

RICE- EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.

RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., PROHENS, J. M. D. R., NUEZ, F. (2009) Variation for bioactive compounds in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. e P.) and implications for breeding. *Euphytica*, 170: 169-181.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. (1998) Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 21 (2): 135-140.

SCHULZ, D. F (2014) Avaliação da utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução como ferramenta para análise de alimentos. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro – RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 181p.

SESSO, H. D., GAZIANO, J. M., LIU S., BURING J. E. (2003) Flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77 (6): 1400-1408.

SHABIR, G. A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr., A* , 987 (1-2): 57-66.

SILVA, A. P., ALVES, M. C. C. (2006) Como iniciar a validação de métodos analíticos. In: Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo, São Paulo. Anais, Remesp- Rede Metrológica do Estado de São Paulo. 1: 8-15.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. (2002) A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Rev. bras. farmacogn.* 12 (1): 35 - 40.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (2000) Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento. Universidade – UFRG, Ed. UFSC. p.394 - 412.

SIMPSON, C. F. (1978) Practical High Performance Liquid Chromatography. Edited by Simpson C.F. London: Heyden & Son, 248 páginas.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman. 836 páginas.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. (1997) *Practical HPLC Method Development*, 2ª ed., Wiley: New York, cap. 15.

SOARES, J. J. (2013) Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Dissertação de Mestrado - Fundação Universidade Federal do Pampa – Uruguaiana - RS, 82 p.

SOCHA, R., JUSZCZAK, L., PIETRZYK, S., FORTUNA, T. (2009) Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneyes. *Food Chemistry*, 113, 568–574.

SOBRATTEE M. A., NEERGHEEN U. S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O. I. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Muta. Res.*, 579: 200-213.

SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H., MOORE, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem*, 30: 1190–1206.

STENGER, F. C. (2011) Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do cloridrato de metformina em comprimidos e estudo de citotoxicidade dos produtos de degradação. Dissertação de Mestrado - Santa Catarina: Universidade do Vale de Itajaí, 123 p.

SUCHANDRA, C., ZAREENA, N., GAUTAM, S., SOUMYAKANTI, A., PRASAD, S. V., ARUN, S. (2007) Antioxidant activity of some phenolic constituents from green

pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragans*). *Food Chemistry*, Barking, 101: 515-523.

SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. (1998) Validação de métodos cromatográficos. *Pharm. Technol.* 2 (3): 12- 20.

TAIZ, L., ZEIGER, E. (2013) Fisiologia Vegetal. 5 a ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p.

TEUTENBERG, T. (2009) Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. *Analytica Chimica Acta*, 643: 1-12.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., FAJGELJ, A., WILLETTS, P., WOOD, R. (1999) Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, ISO, IUPAC and AOAC International Technical report. *Pure Appl. Chem.*, 71 (2): 337- 348.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L. R., WOOD, R. (2002) Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, IUPAC Technical report. *Pure Appl. Chem.*, 74 (5): 835 – 855.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A., FERRERES, F., BLÁZQUEZ, A., GARCÍA-VIGUERA, C., TOMÁS-LORENTE, F. (1993) High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography*, 634: 41-46.

TOPUZ, A., DINCER, C., ÖZDEMİR, K. S., FENG, H., KUSHAD, M. (2011) Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv., Jalapeno). *Food Chemistry*, 129 (3): 860-865.

TOPUZ, A., OZDEMIR, F. (2004) Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika. *Food Chemistry*, Barking, 86: 509-515.

TOPUZ, A., OZDEMIR, F. (2007) Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Compositions and Analyses*, San Diego, 20: 596-602.

TORRAS-CLAVERIA, L., JÁUREGUI, O., CODINA, C., TIBURCIO, A.S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. (2012). Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science*, 182: 71-78.

TSIAPARA, A. V., JAAKKOLA, M., CHINOU, I., GRAIKOU, K., TOLONEN, T., VIRTANEN, V., MOUTSATSOU, P. (2009) Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: profile analysis of extracts. *Food Chemistry*, 116 (3): 702-708.

VESSMAN, J., STEFAN, R. I., STADEN, J. F. V., DANZER, K., LINDNER, W., BURNS, D. T., FAJGELJ, A., MÜLLER, H. (2001) Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendation). *Pure and Applied Chemistry*, 73: 1381- 1386.

VIAL, J., JARDY, A. (2001) Interlaboratory studies: the best way to estimate dispersion of an HPLC method and a powerful tool for analytical transfers. *Chromatographia*, 53: 141-148.

WAGNER, C. M. (2003) Variabilidade e base genética de pungência e caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Tese de Doutorado – Piracicaba- SP, Universidade de São Paulo, 104 p.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A. R., SUDARMONOWATI, E., BINO, R.J., BOVY, A.G. (2011) Metabolite diversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72 (11/12): 1358-1370.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A.-R., SUDARMONOWATI, E., BINO, R.J., BOVY, A.G. (2013) Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J. Nat. Prod.* 76 (4): 783- 793.

WANG, J.; TURNIPSEED, S. B. (2012) Chemical Analysis: Quantitative and Confirmatory Methods. In: Wang, J.; Macneil, J. D.; Kay, J. F. *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food*. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons. 1^a ed., 6: 187-226.

WILLIAMS, R. J., SPENCER, J. P. E., RICE-EVANS, C. (2004). Flavonoids: Antioxidant or signalling molecules? Free Radical. *Biology & Medicine*, 36: 838-849.

WREN, S. A. C., TCHELITCHEFF, P. (2006) Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*. 1119: 140-146.

ZHONG, Y., SHAHIDI, F. (2012) Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological systems. *Food Chemistry*, 131: 22–30.

ZHUANG, Y., CHEN, L., SUN, L., CAO, J. (2012) Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *Journal of Functional Foods*, 4: 333-338.

ZHUN, C., GOODALL, D., WREN, S. (2005) Elevated temperature HPLC: principles and applications to small molecules and biomolecules. *LCGC Asia Pacific*, 8 (1): 48-59.

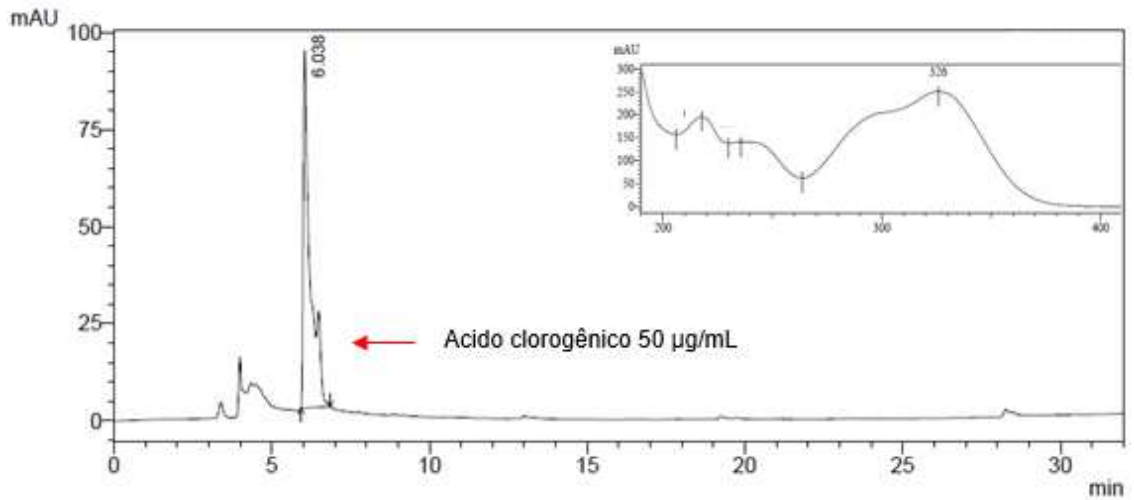
ZILLOTTO, J., FARINA, C., CRISTHINIA, K. B. de S. (2012) Validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 33 (03): 341-346.

ZIMMER ,A. R., LEONARDIA, B., MIRONA , D., SCHAPOVALA, E., OLIVEIRA, J. R., GOSMANNA, G. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of

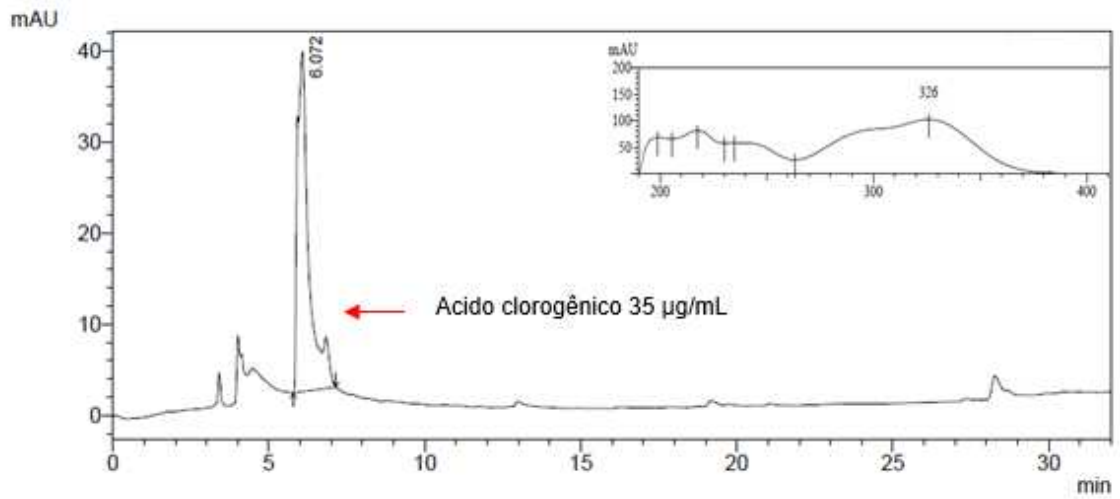
Capsicum baccatum: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 228– 233.

ZUANAZZI, J. A. S., MONTANHA, J. A. (2010) Flavonoides. In. Simões, C.M.O. (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto alegre: UFRGS, 577-614.

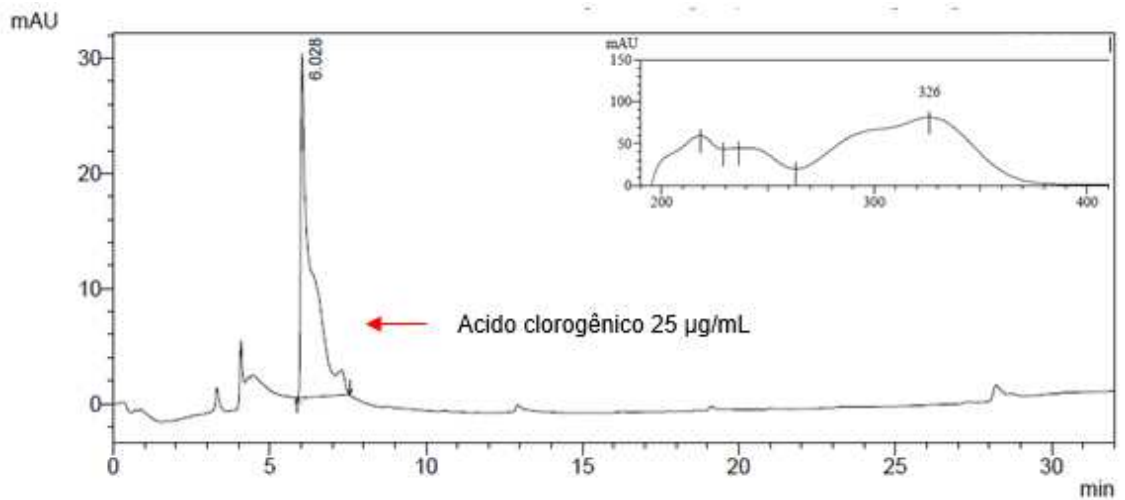
APÊNDICE



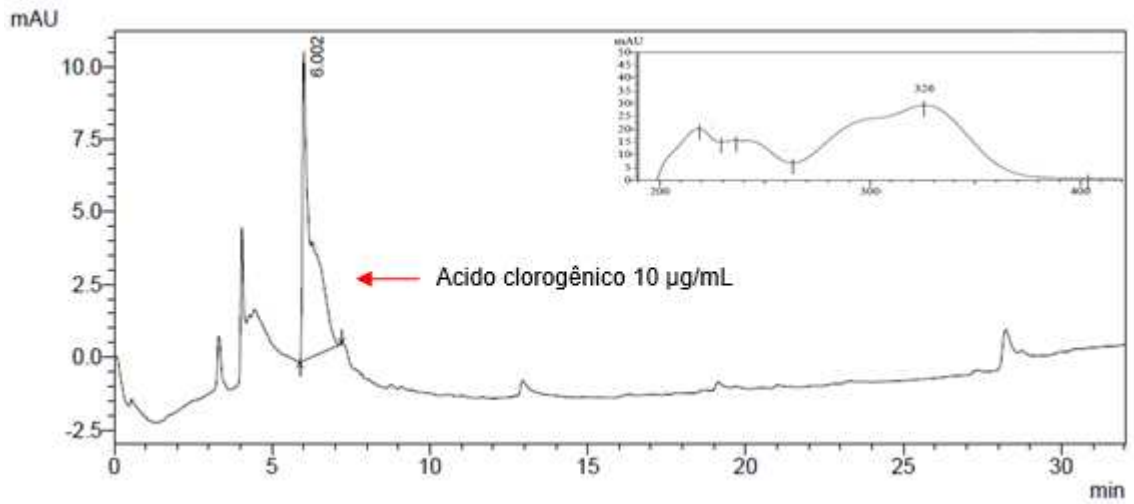
Cromatograma 1: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 50 µg/mL.



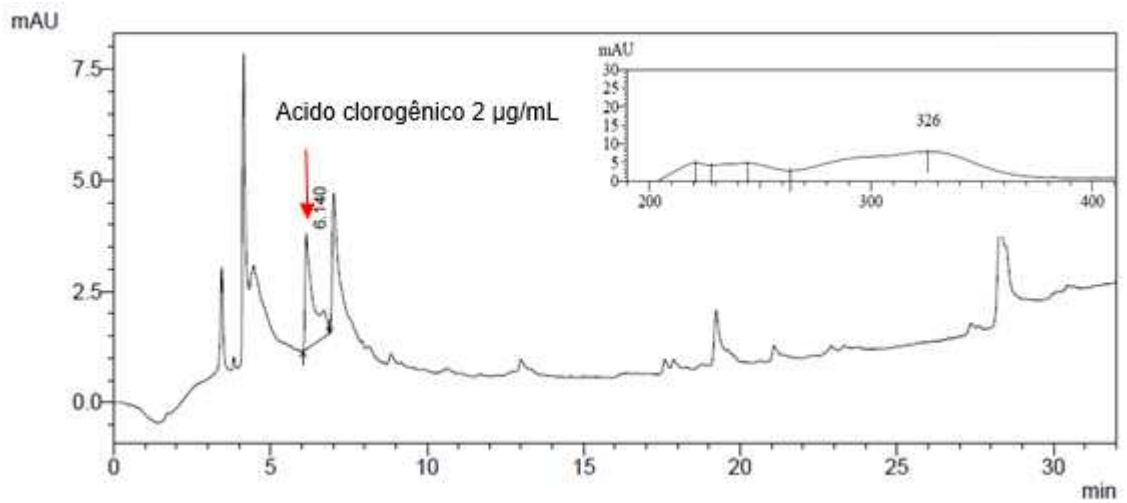
Cromatograma 2: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 35 µg/mL.



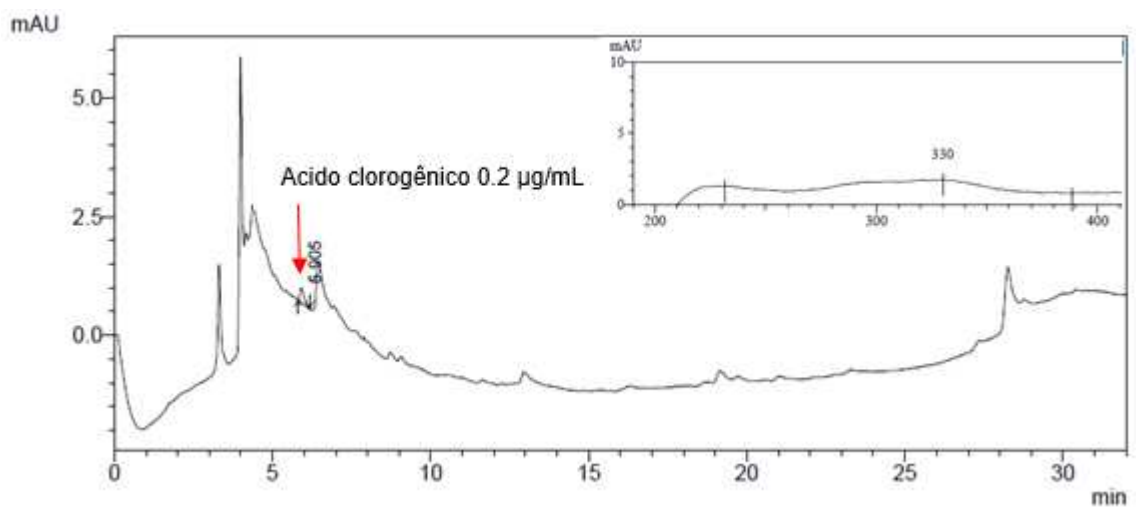
Cromatograma 3: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 25 µg/mL.



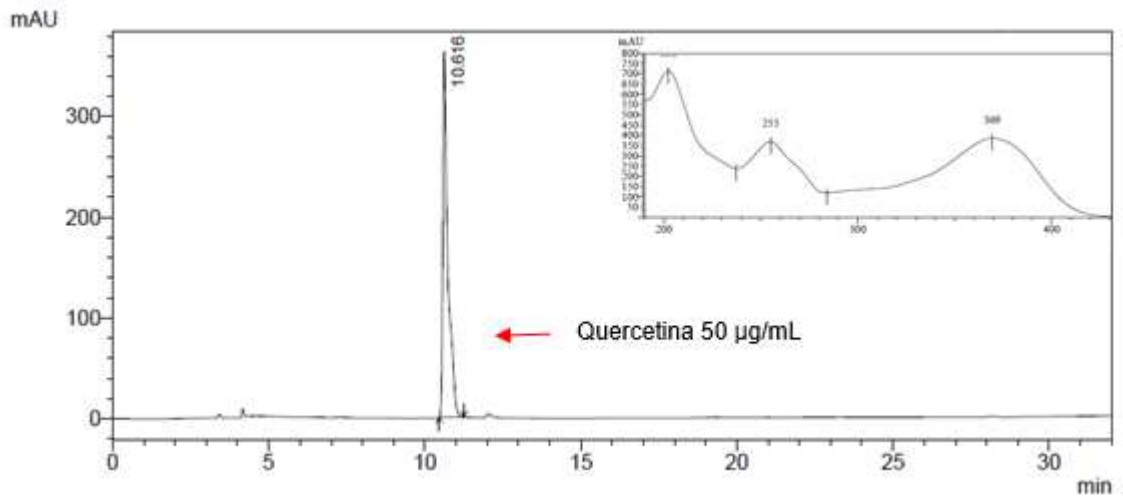
Cromatograma 4: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 10 µg/mL.



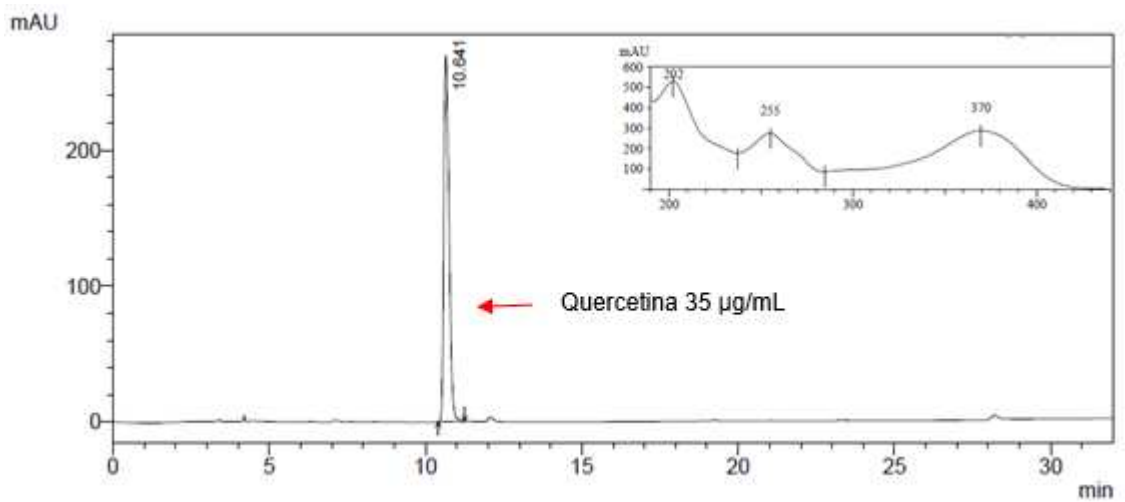
Cromatograma 5: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 2 µg/mL.



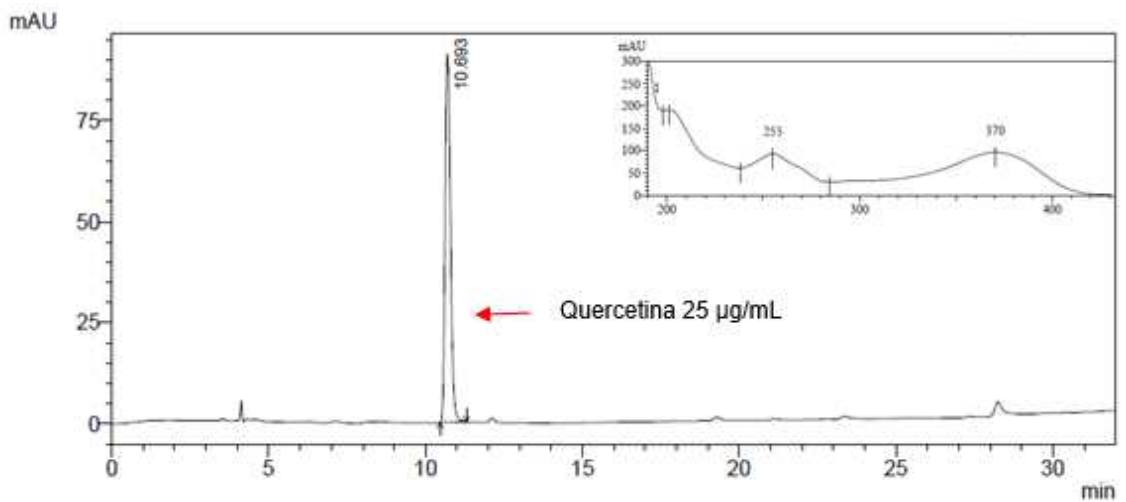
Cromatograma 6: Parâmetro Linearidade – Ácido clorogênico 0.2 µg/mL.



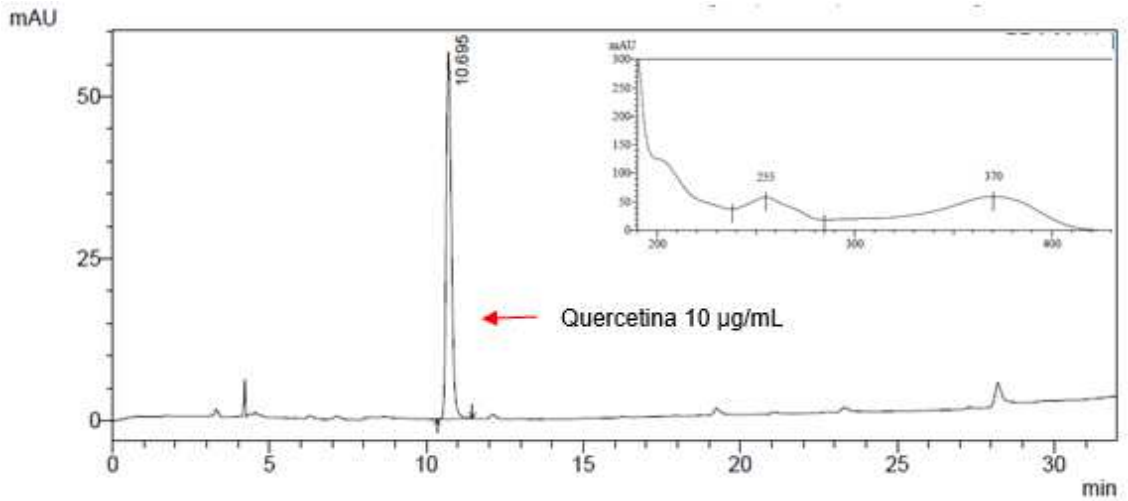
Cromatograma 7: Parâmetro Linearidade – Quercetina 50 µg/mL.



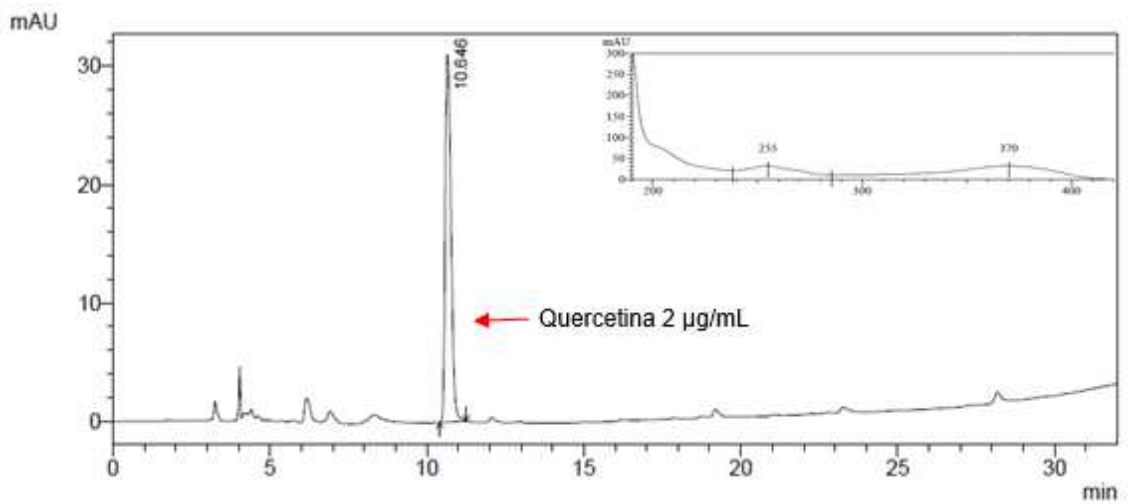
Cromatograma 8: Parâmetro Linearidade – Quercetina 35 µg/mL.



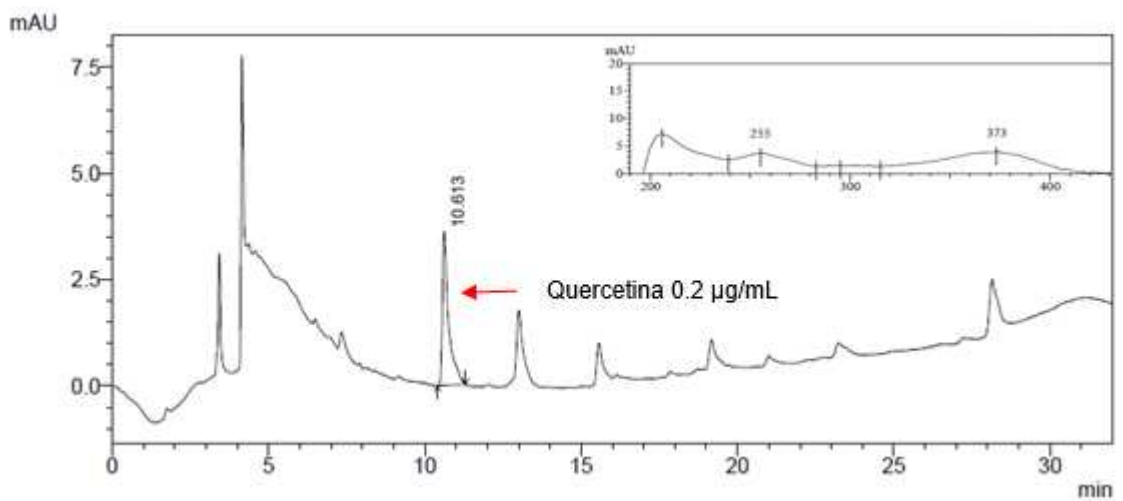
Cromatograma 9: Parâmetro Linearidade – Quercetina 25 µg/mL.



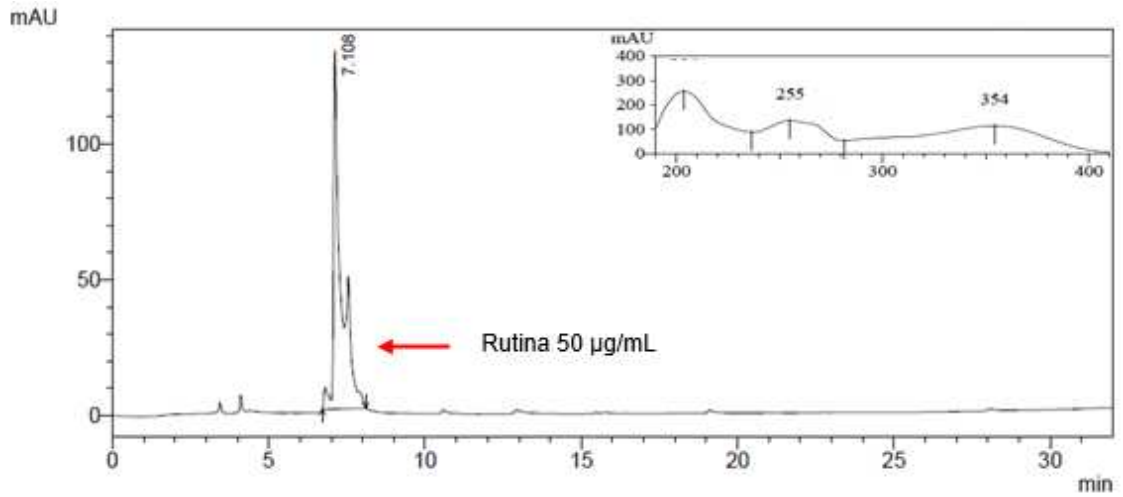
Cromatograma 10: Parâmetro Linearidade – Quercetina 10 µg/mL.



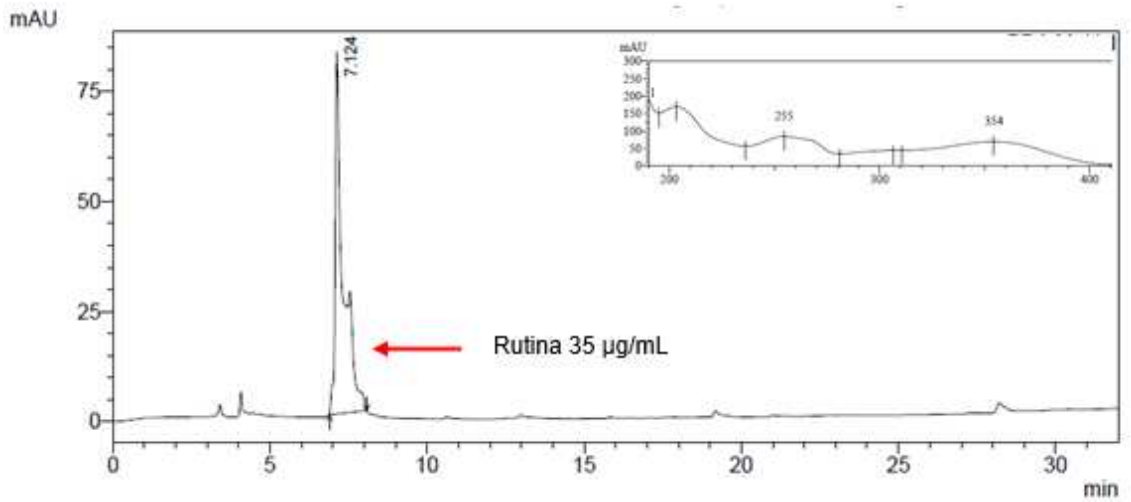
Cromatograma 11: Parâmetro Linearidade – Quercetina 2 µg/mL.



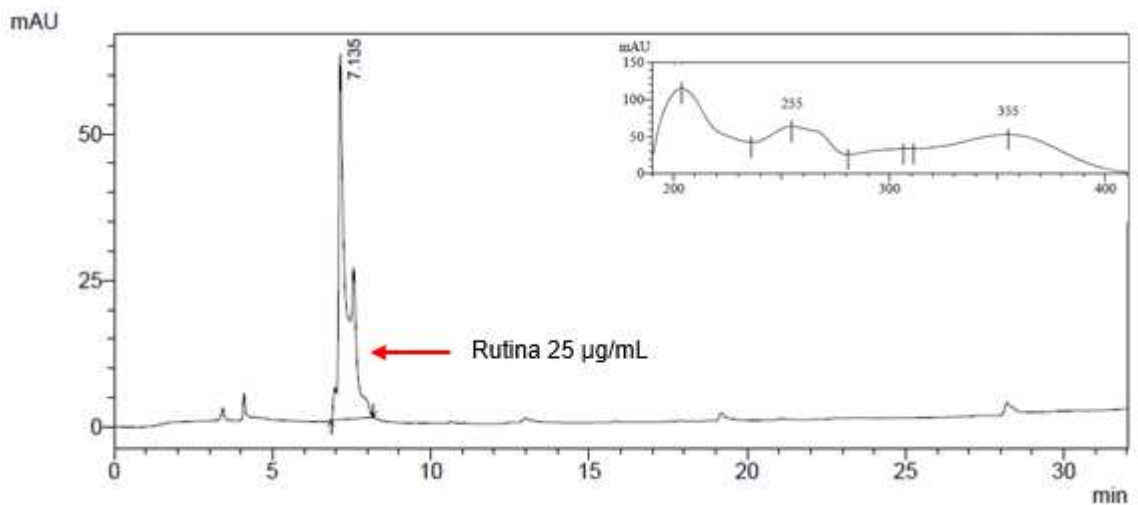
Cromatograma 12: Parâmetro Linearidade – Quercetina 0.2 µg/mL.



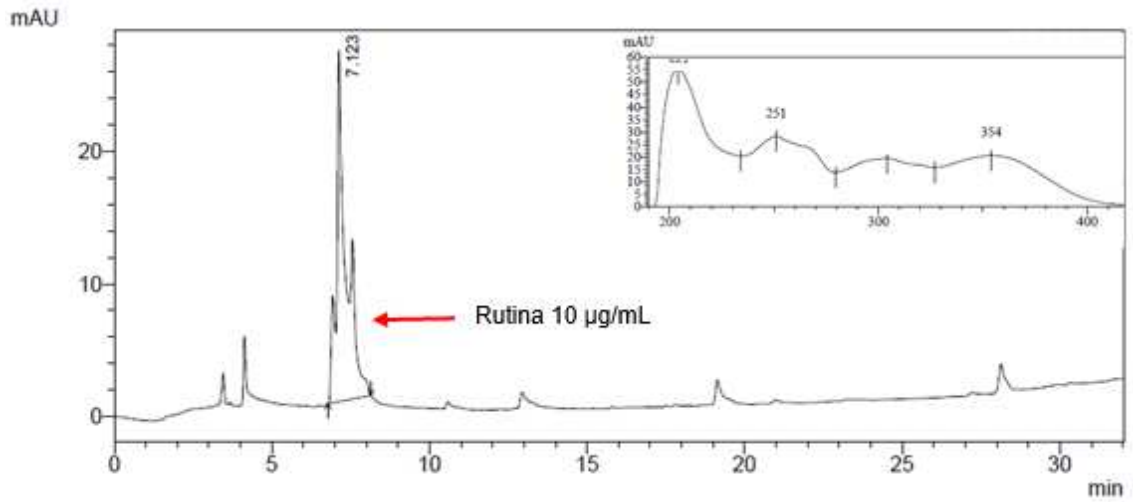
Cromatograma 13: Parâmetro Linearidade – Rutina 50 µg/mL.



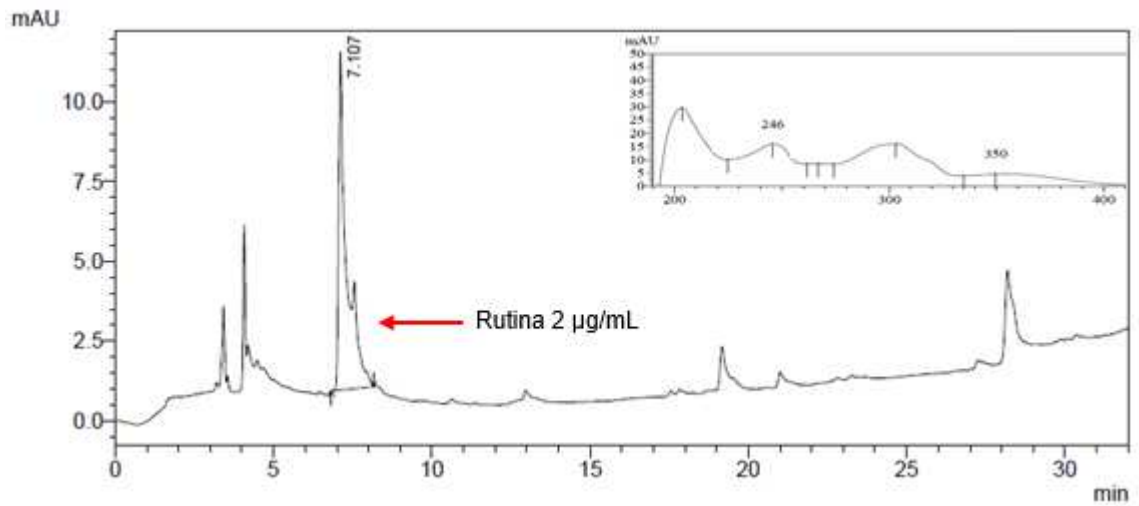
Cromatograma 14: Parâmetro Linearidade – Rutina 35 µg/mL.



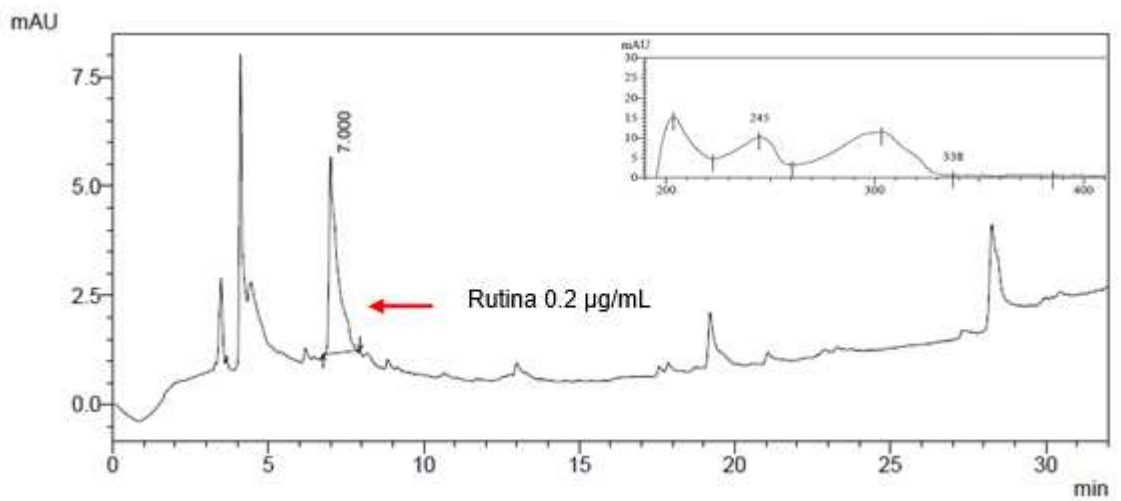
Cromatograma 15: Parâmetro Linearidade – Rutina 25 µg/mL.



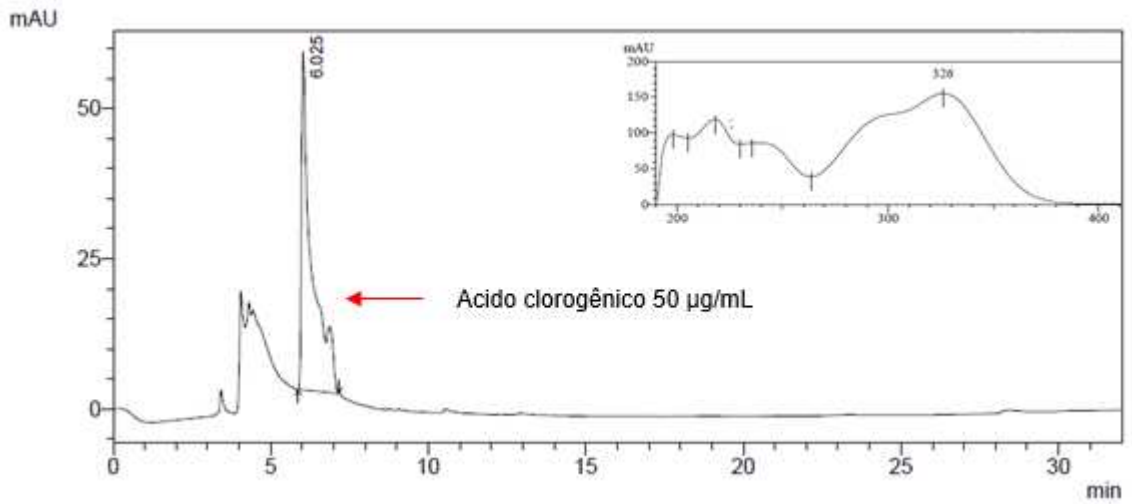
Cromatograma 16: Parâmetro Linearidade – Rutina 10 µg/mL.



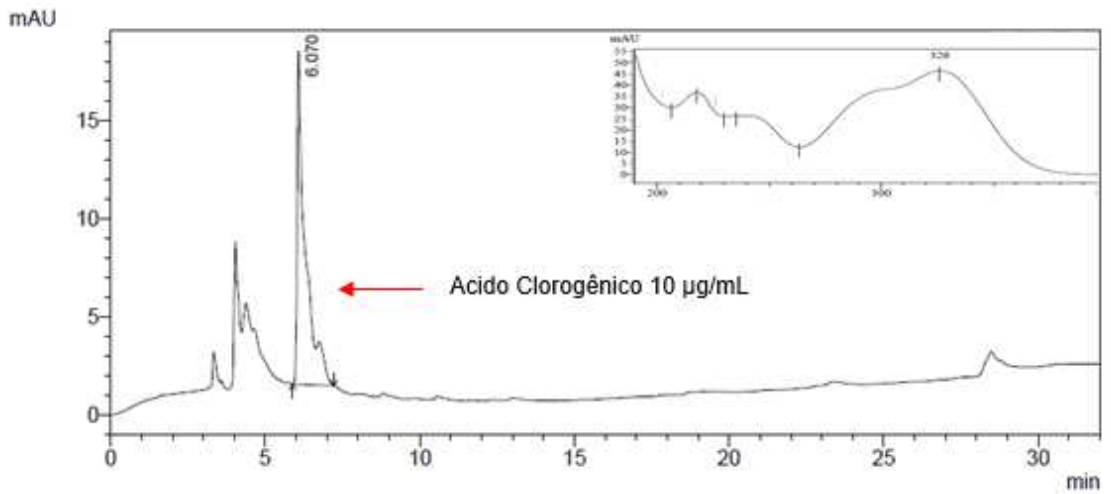
Cromatograma 17: Parâmetro Linearidade – Rutina 2 µg/mL.



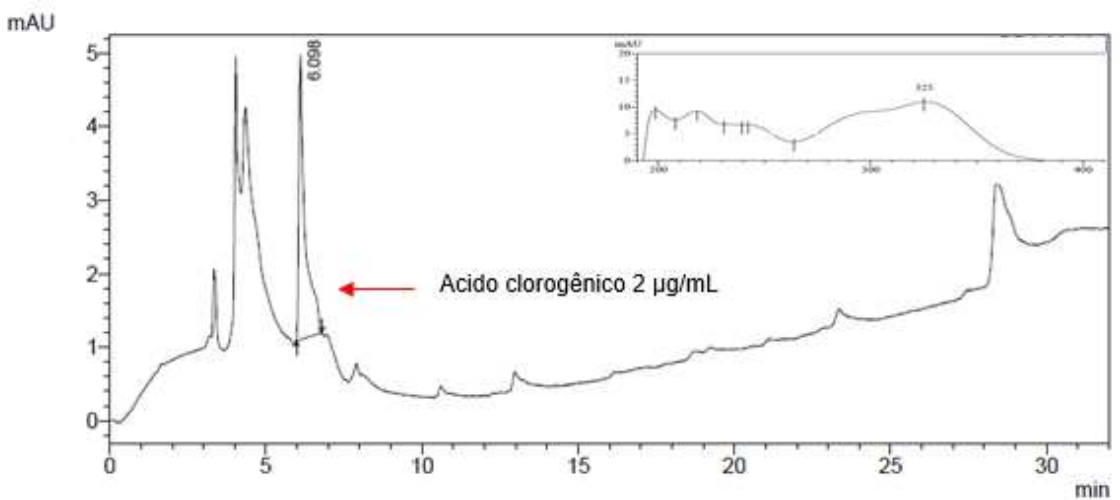
Cromatograma 18: Parâmetro Linearidade – Rutina 0.2 µg/mL.



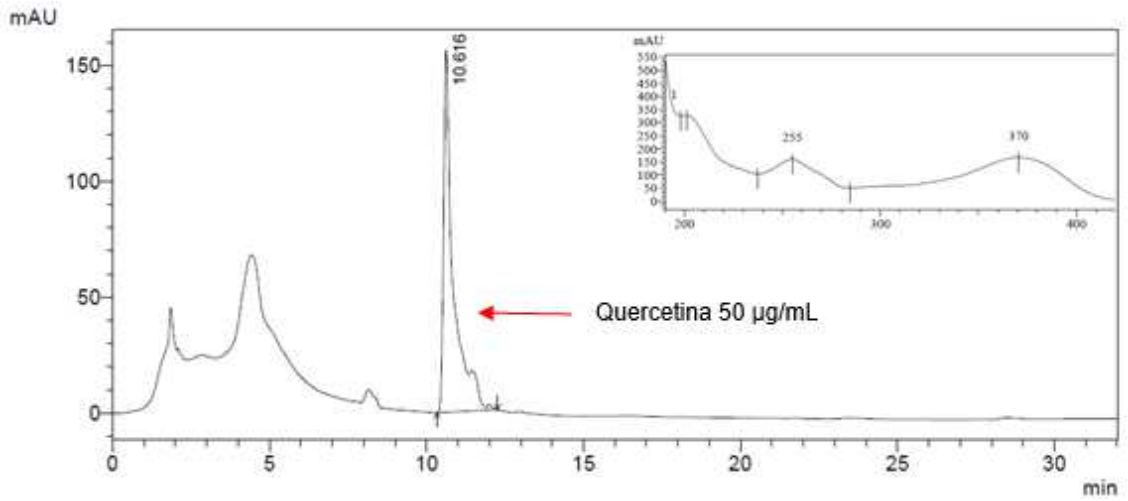
Cromatograma 19: Parâmetro Repetitividade – Ácido clorogênico 50 µg/mL.



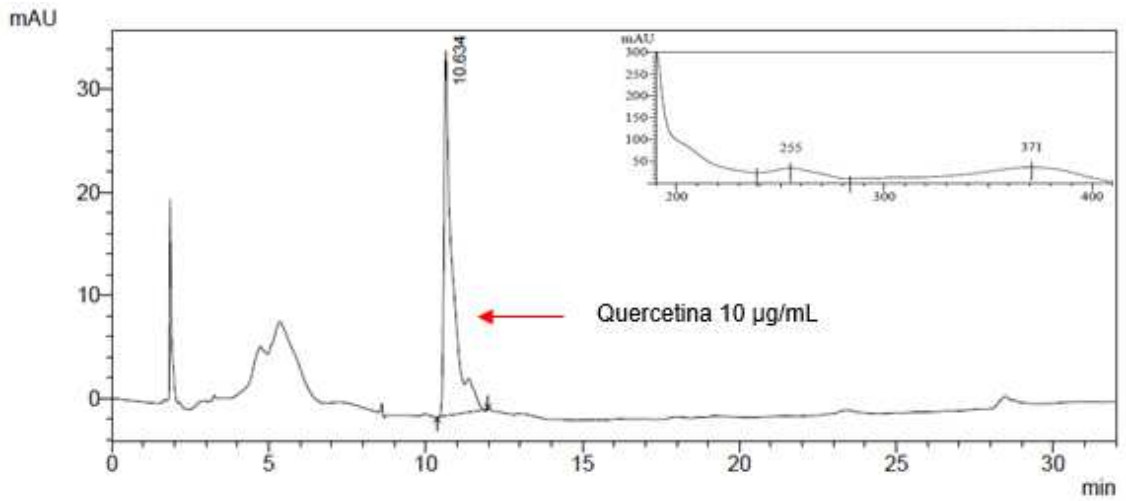
Cromatograma 20: Parâmetro Repetitividade – Ácido clorogênico 10 µg/mL.



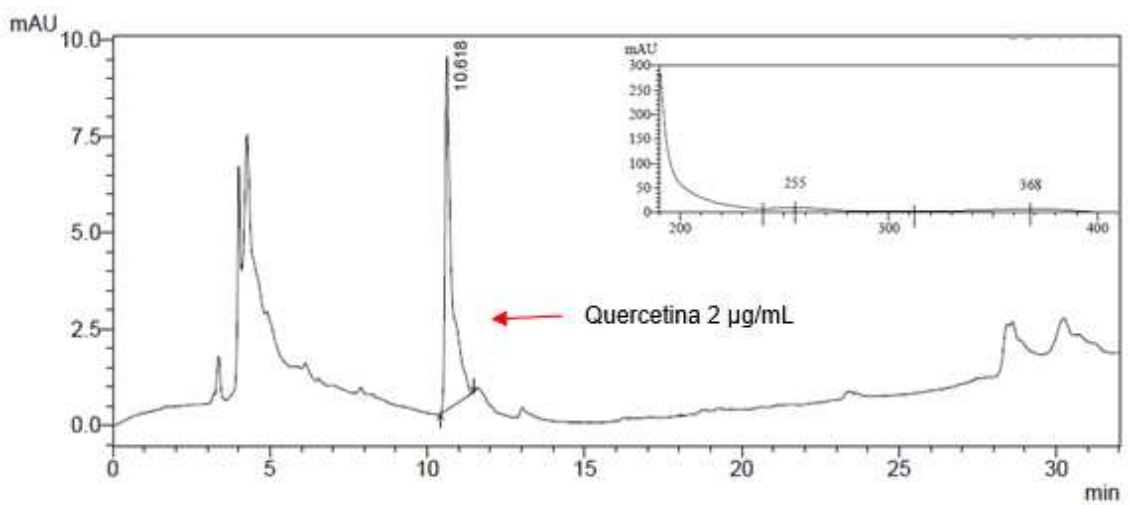
Cromatograma 21: Parâmetro Repetitividade – Ácido clorogênico 2 µg/mL.



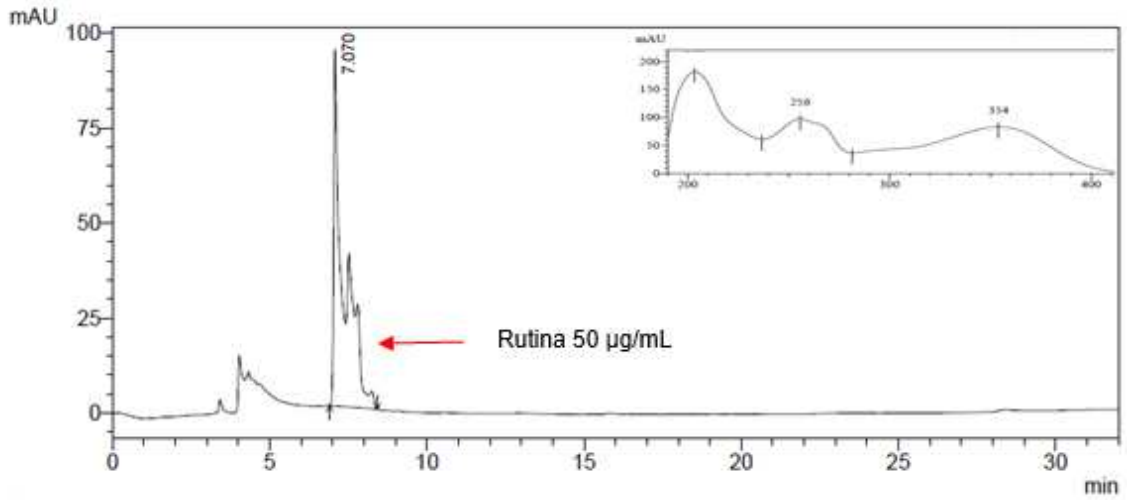
Cromatograma 22: Parâmetro Repetitividade – Quercetina 50 µg/mL.



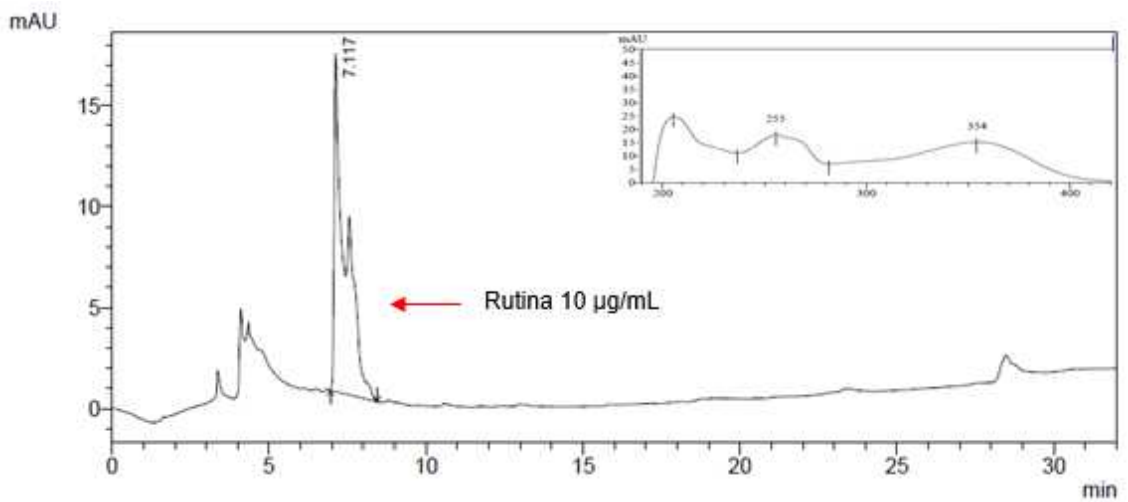
Cromatograma 23: Parâmetro Repetitividade – Quercetina 10 µg/mL.



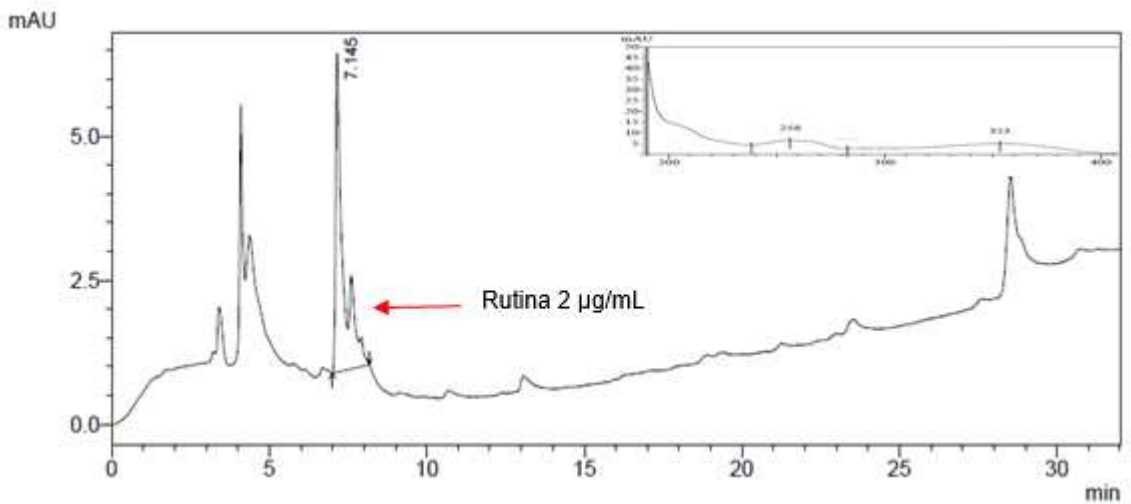
Cromatograma 24: Parâmetro Repetitividade – Quercetina 2 µg/mL.



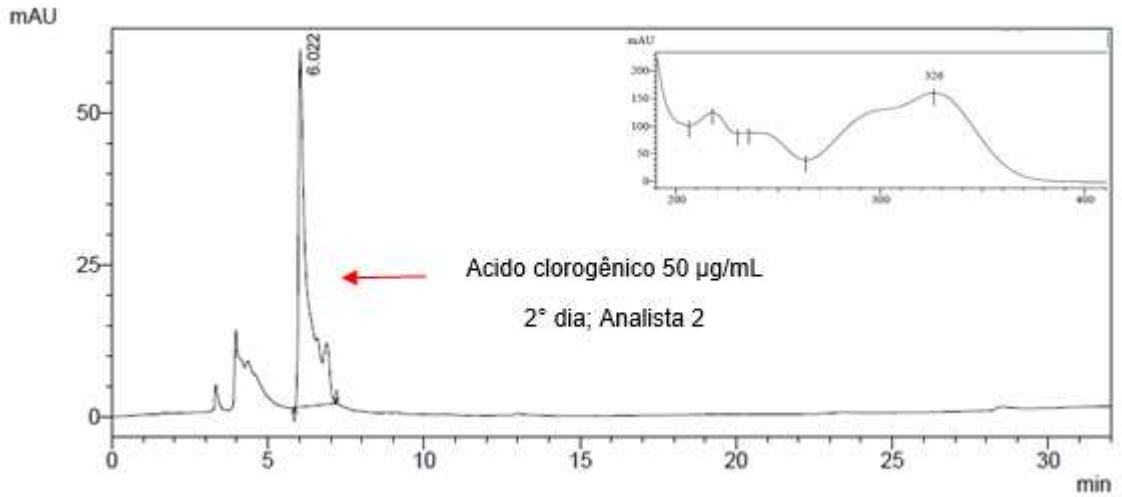
Cromatograma 25: Parâmetro Repetitividade – Rutina 50 µg/mL.



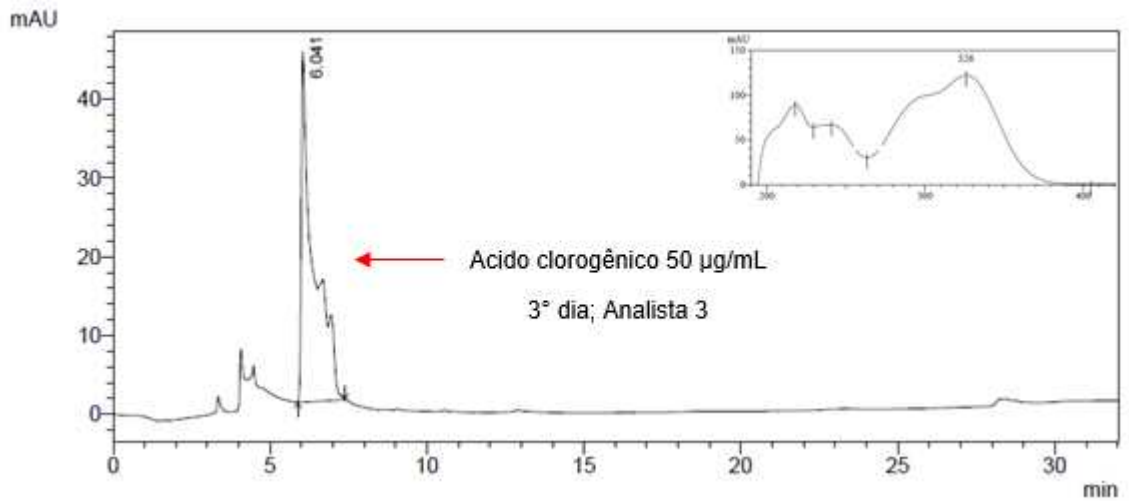
Cromatograma 26: Parâmetro Repetitividade – Rutina 10 µg/mL.



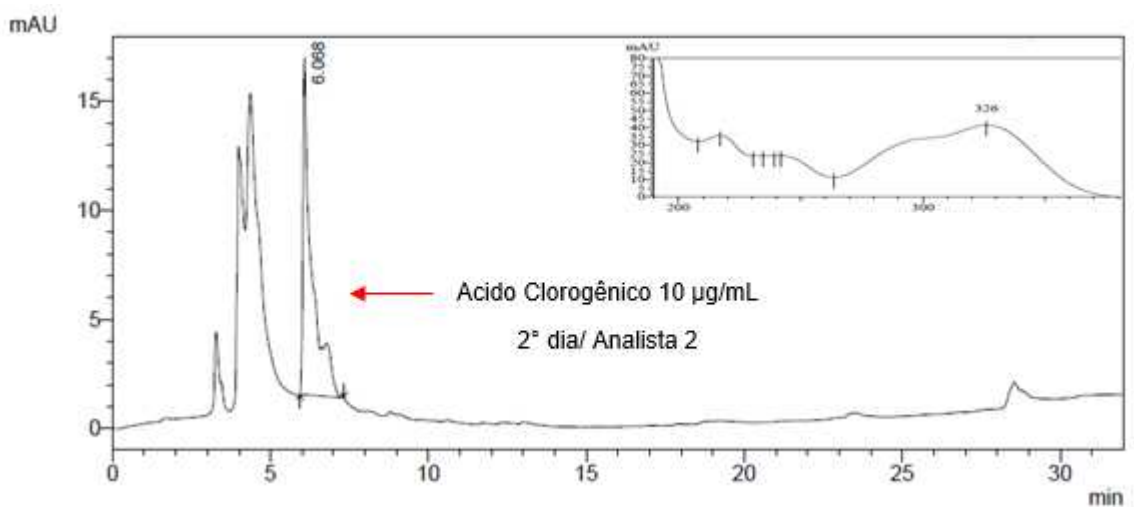
Cromatograma 27: Parâmetro Repetitividade – Rutina 2 µg/mL.



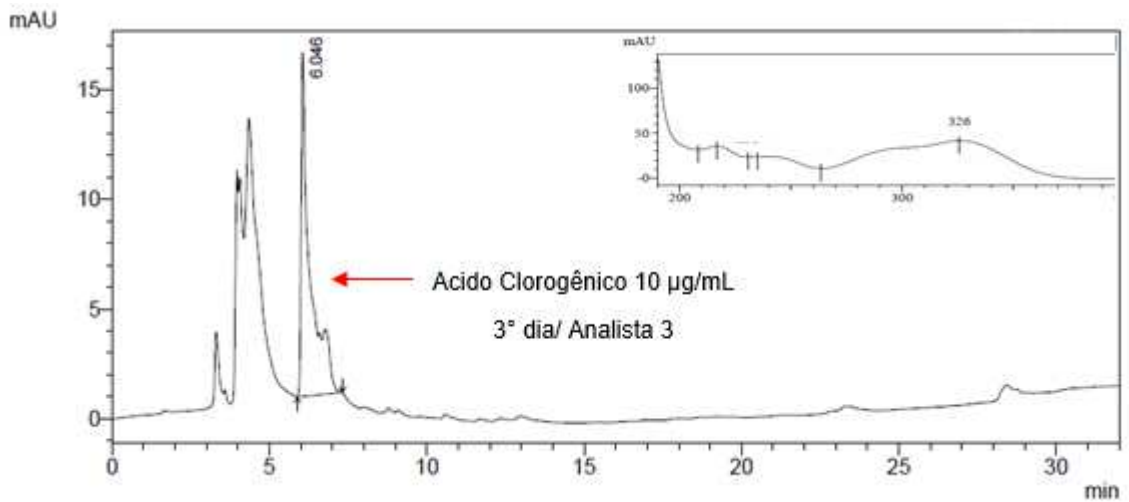
Cromatograma 28: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 50 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



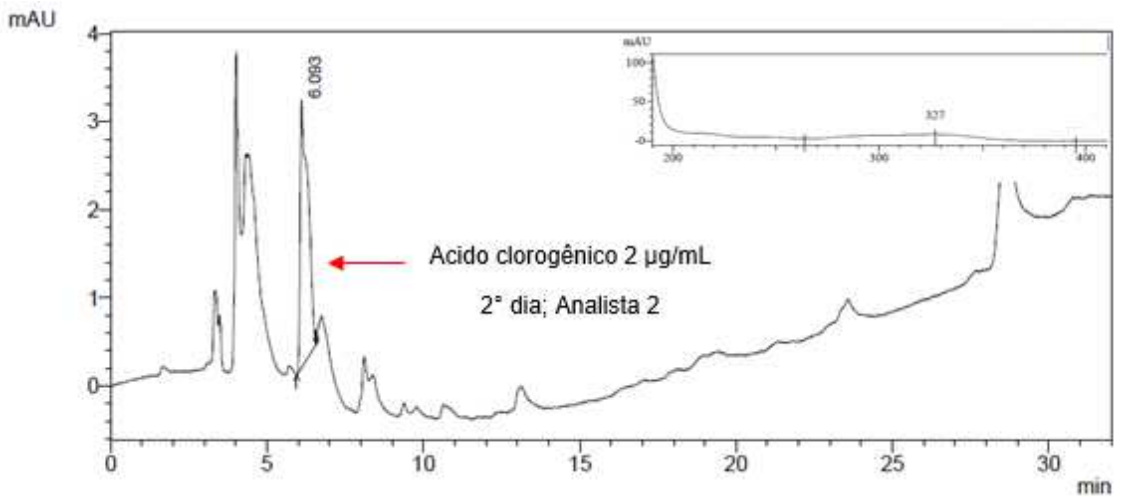
Cromatograma 29: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 50 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



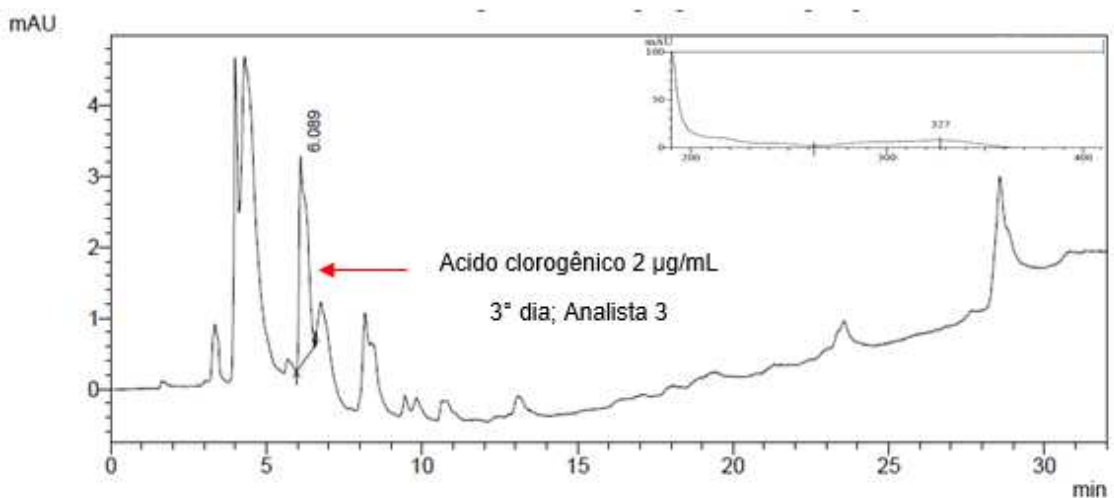
Cromatograma 30: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 10 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



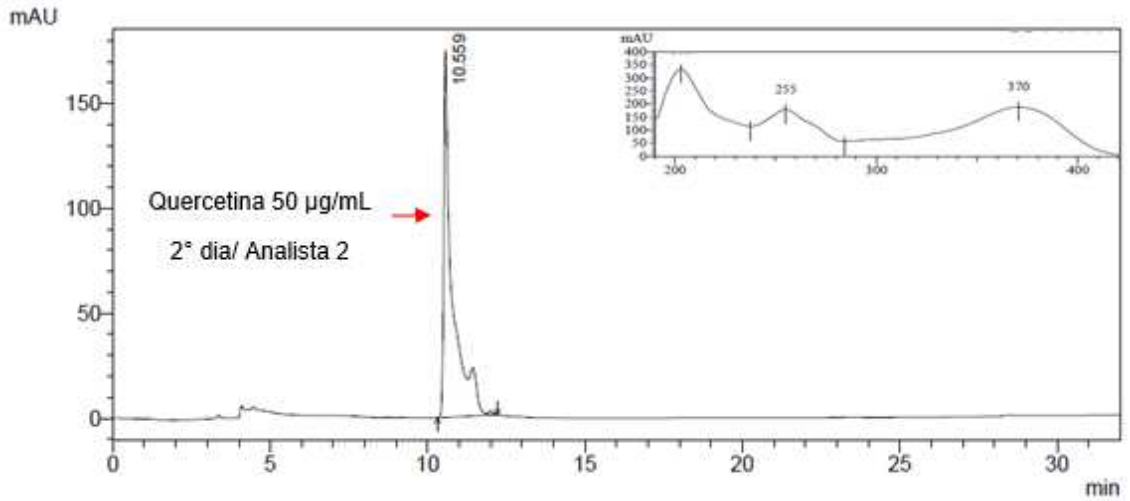
Cromatograma 31: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 10 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



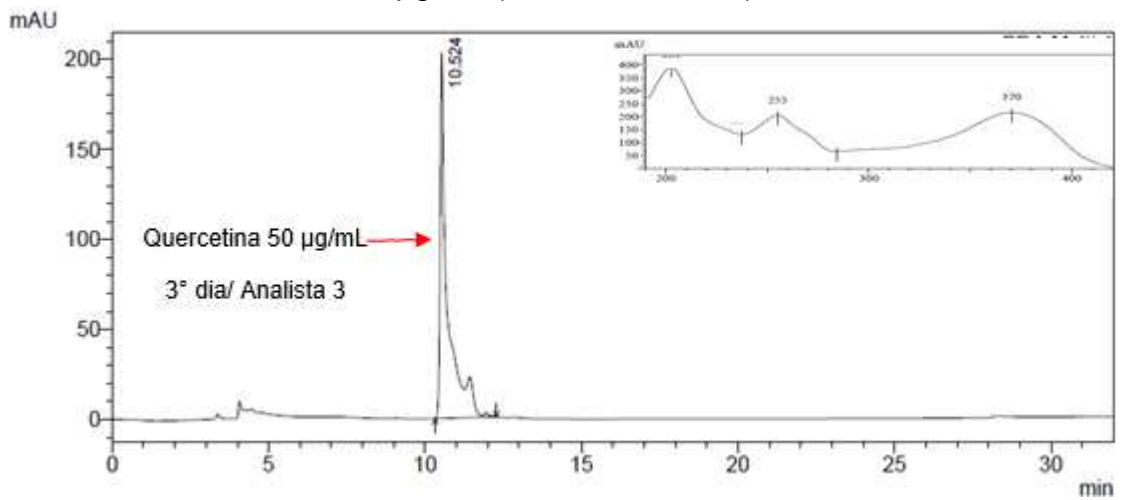
Cromatograma 32: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 2 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



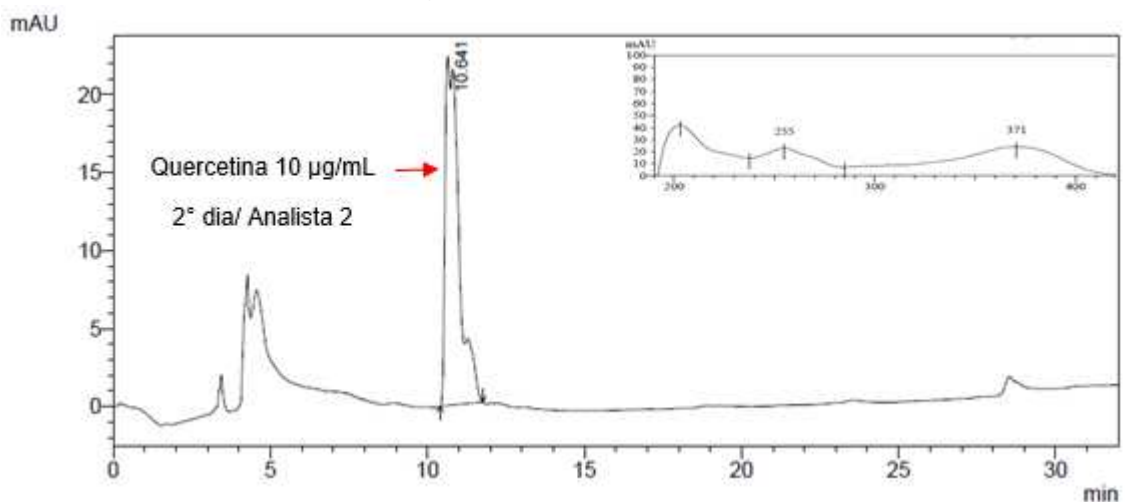
Cromatograma 33: Parâmetro Precisão Intermediária – Ácido clorogênico 2 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



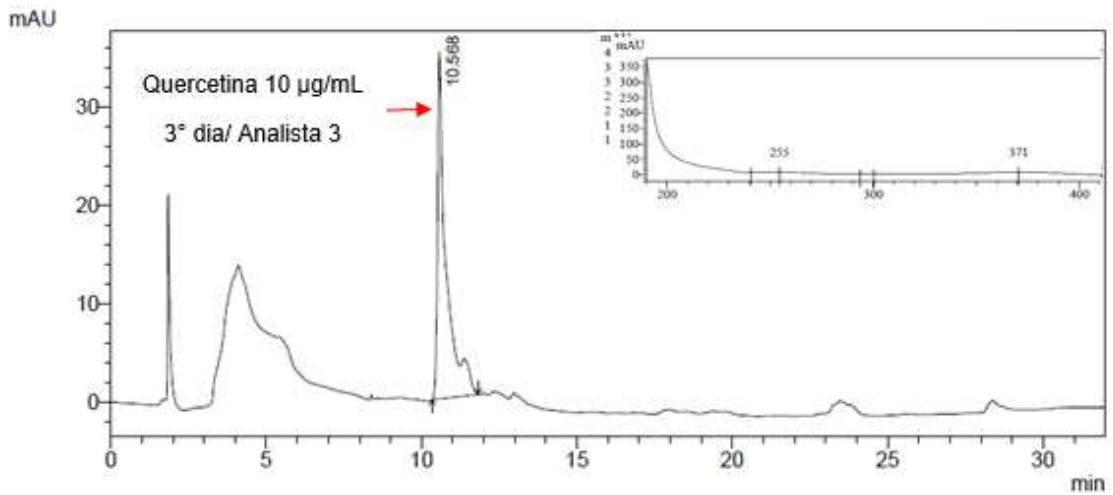
Cromatograma 34: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 50 µg/mL (2º dia/ Analista 2).



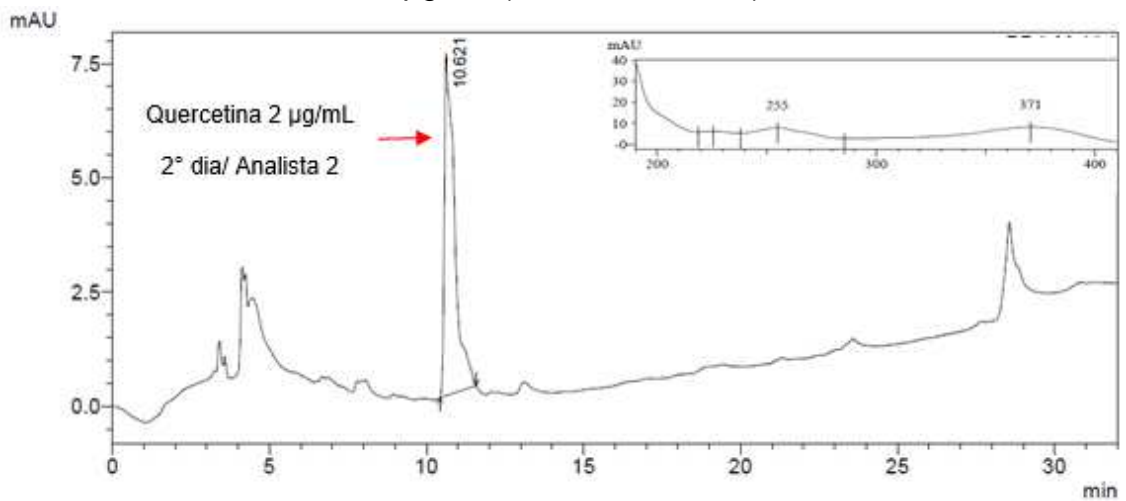
Cromatograma 35: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 50 µg/mL (3º dia/ Analista 3).



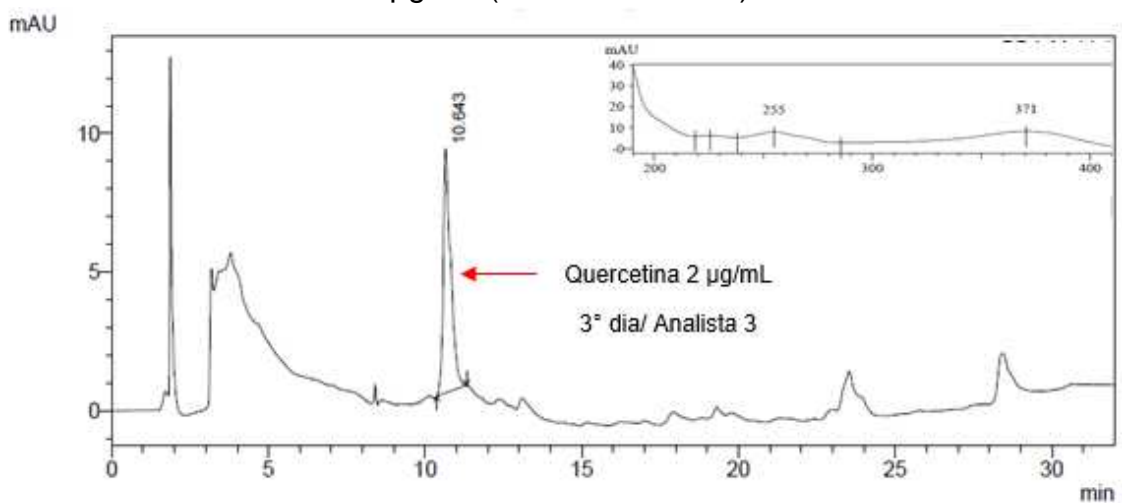
Cromatograma 36: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 10 µg/mL (2º dia/ Analista 2).



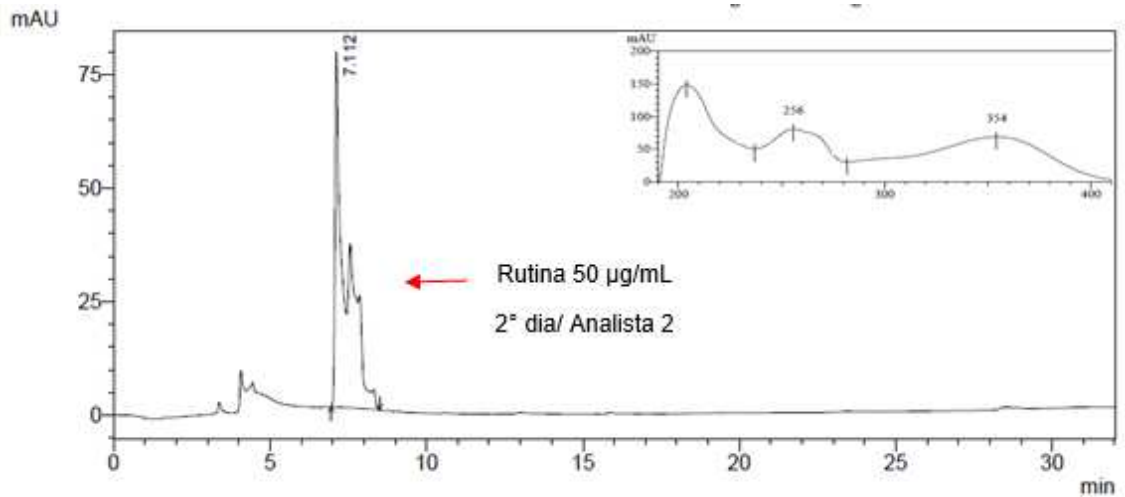
Cromatograma 37: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 10 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



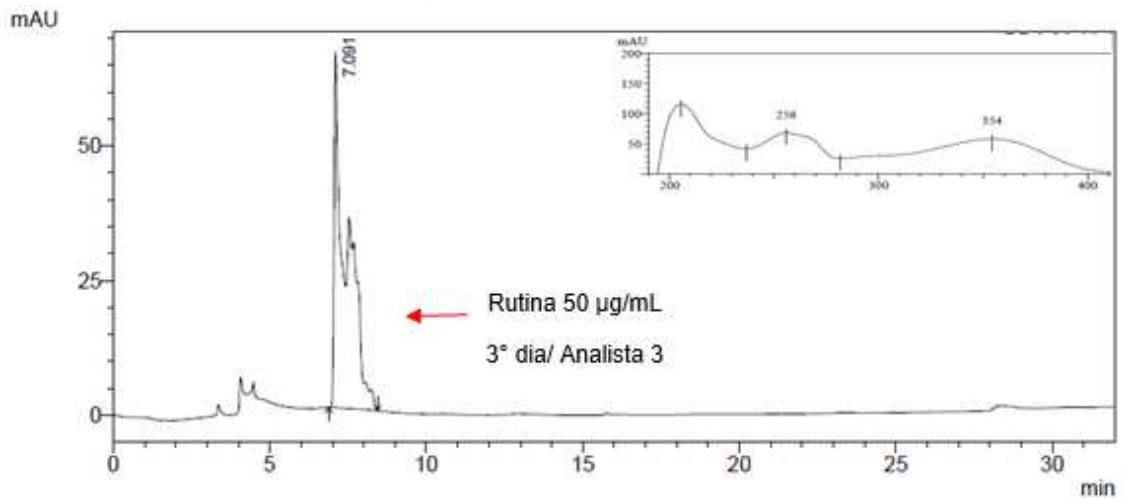
Cromatograma 38: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 2 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



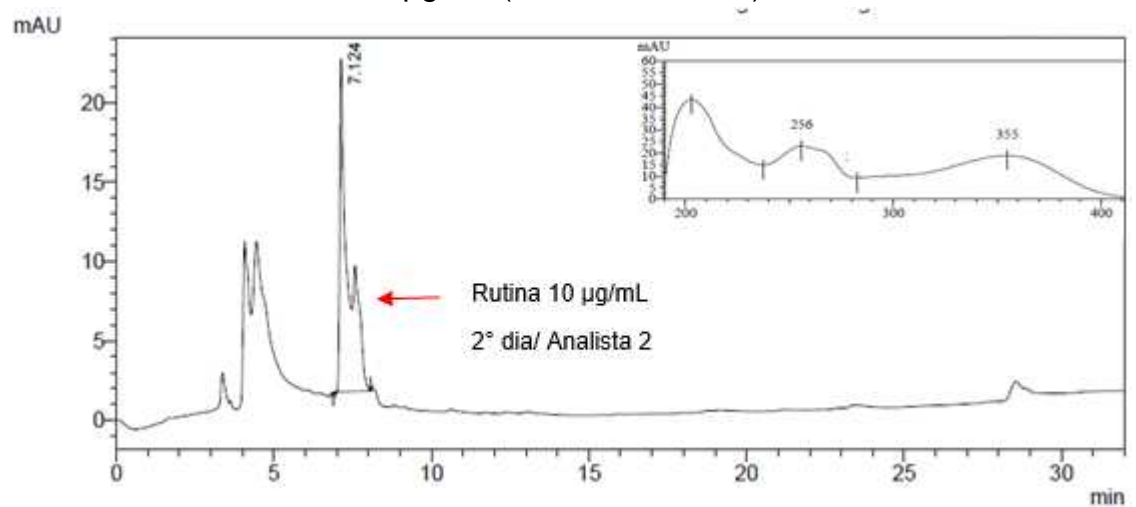
Cromatograma 39: Parâmetro Precisão Intermediária – Quercetina 2 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



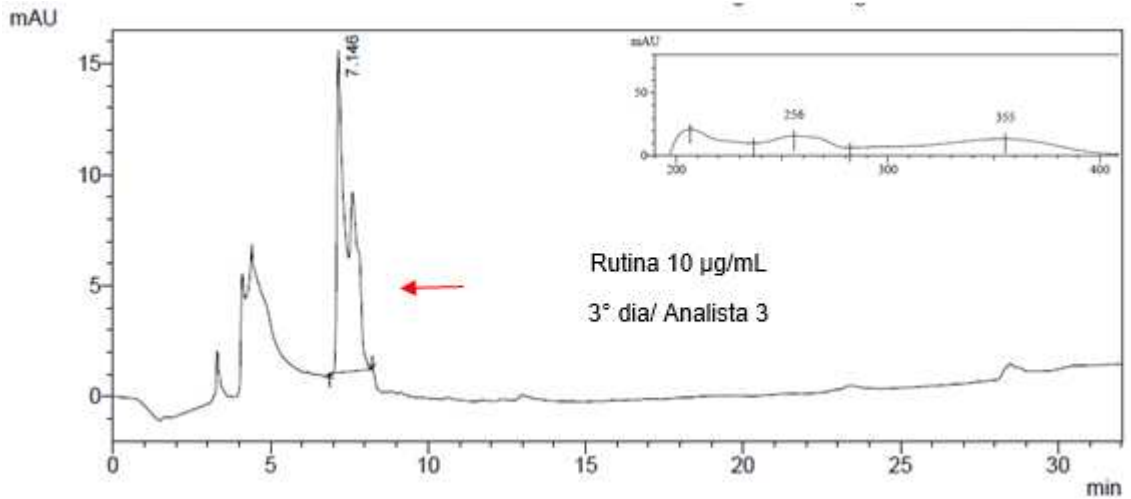
Cromatograma 40: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina 50 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



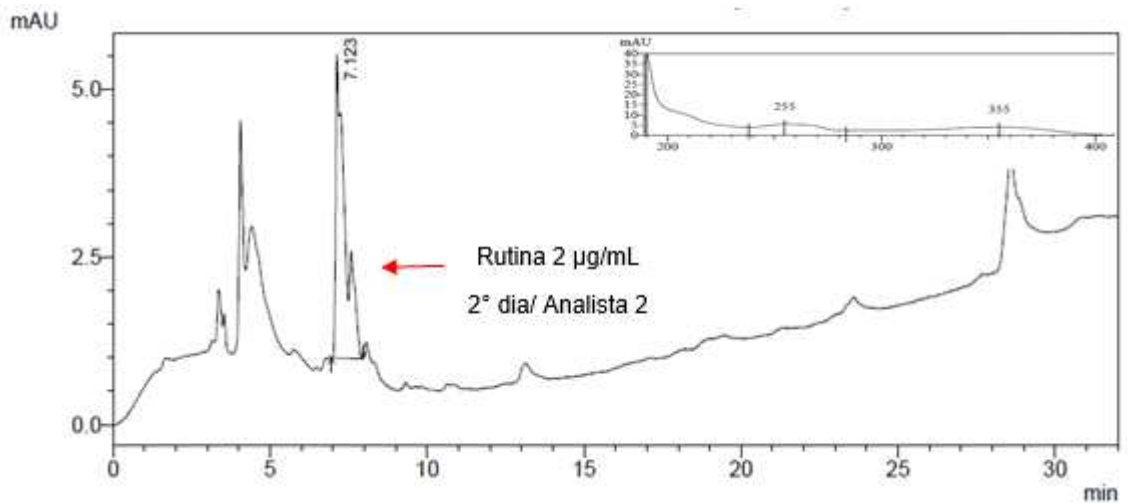
Cromatograma 41: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina 50 µg/mL (3° dia/ Analista 3).



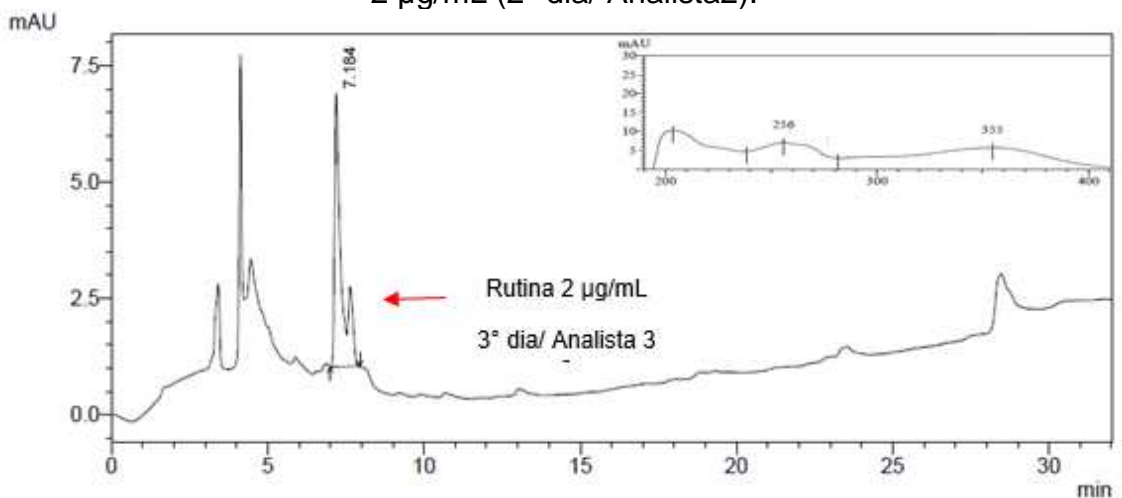
Cromatograma 42: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina 10 µg/mL (2° dia/ Analista 2).



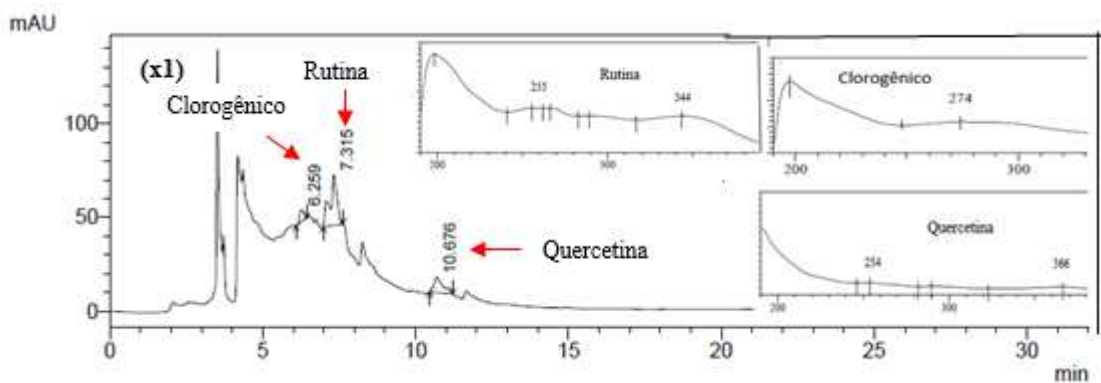
Cromatograma 43: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina
10 µg/mL (3º dia/ Analista 3).



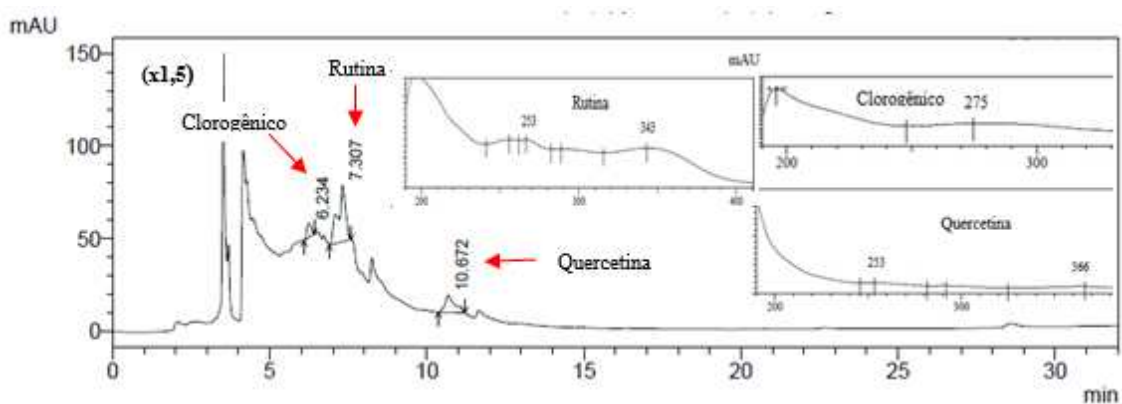
Cromatograma 44: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina
2 µg/mL (2º dia/ Analista 2).



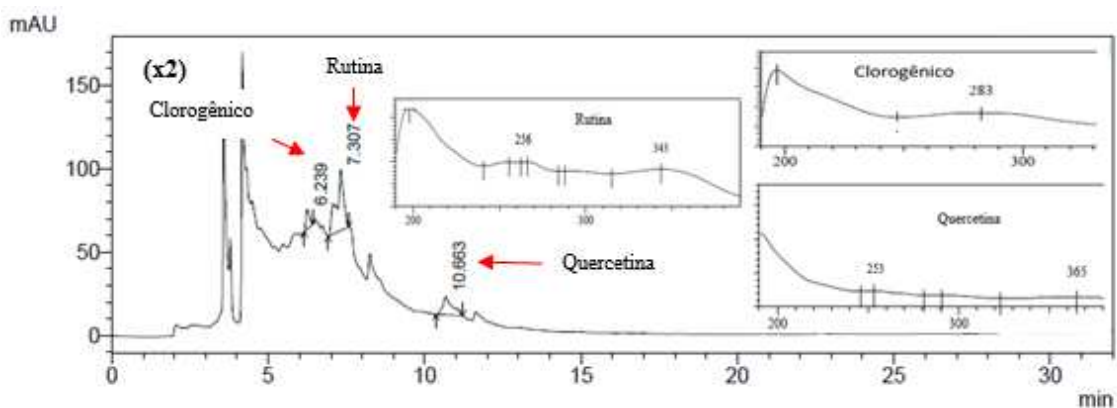
Cromatograma 45: Parâmetro Precisão Intermediária – Rutina
2 µg/mL (3º dia/ Analista 3).



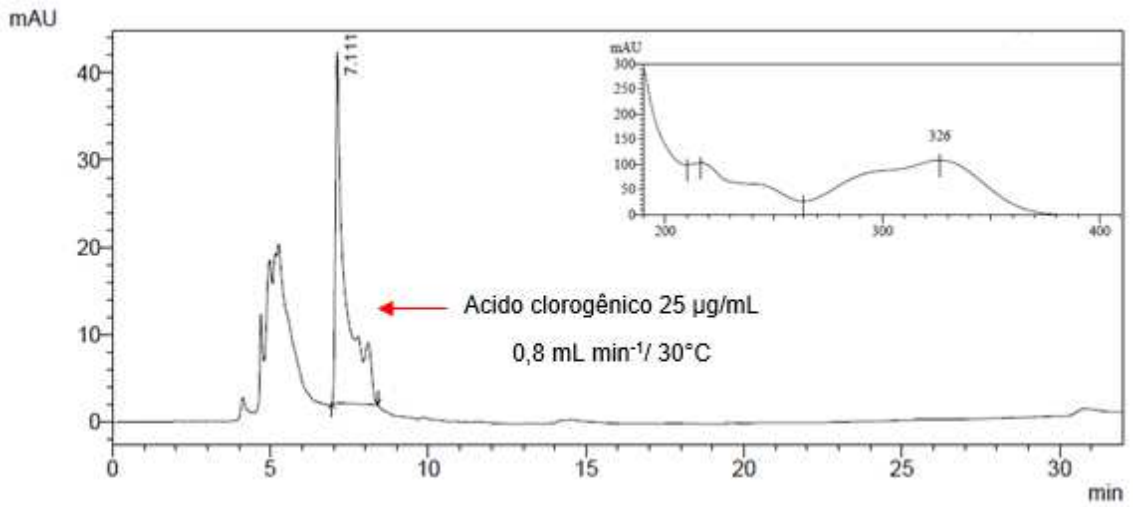
Cromatograma 46: Parâmetro Exatidão - Amostra de pimenta (Concentração x1).



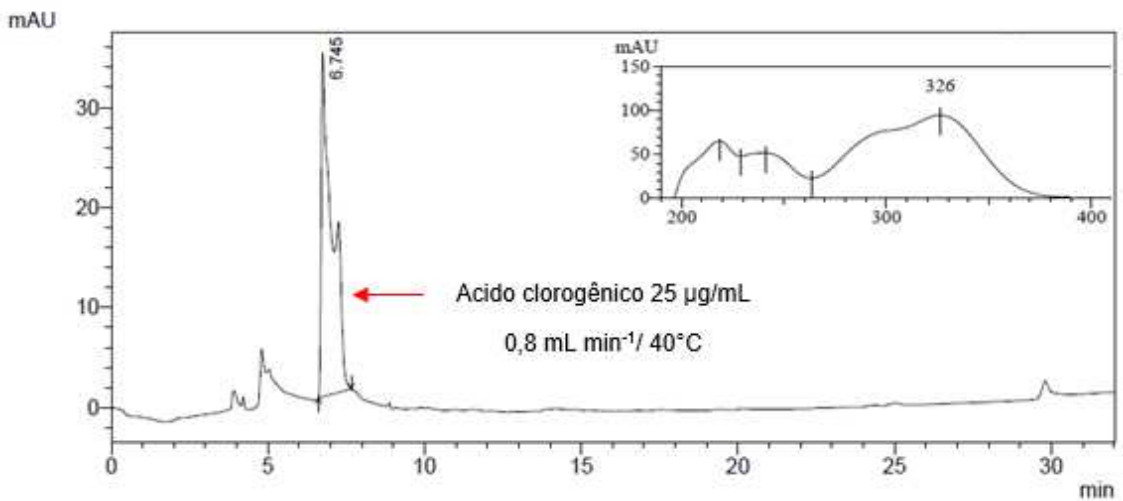
Cromatograma 47: Parâmetro Exatidão - Amostra de pimenta (Concentração x1,5).



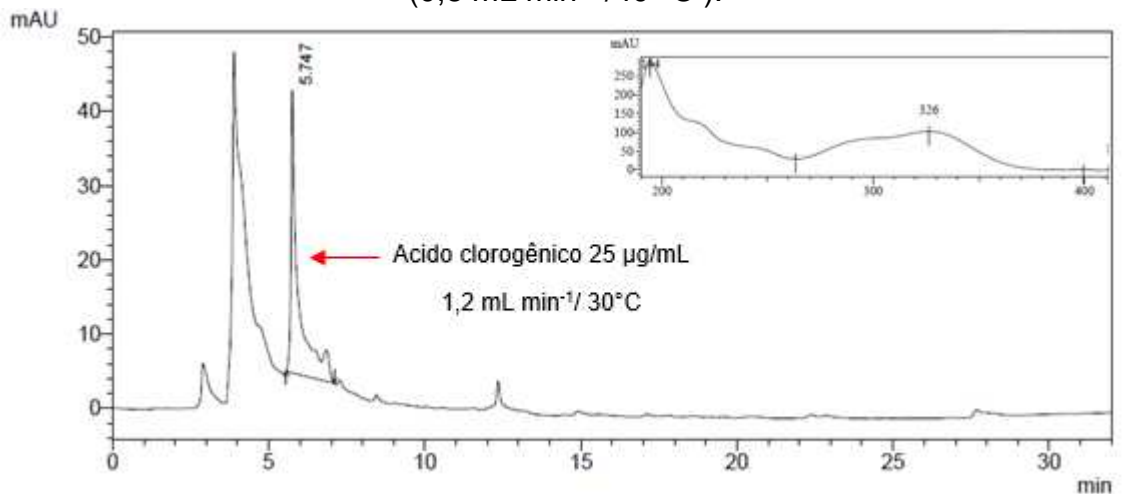
Cromatograma 48: Parâmetro Exatidão - Amostra de pimenta (Concentração x2).



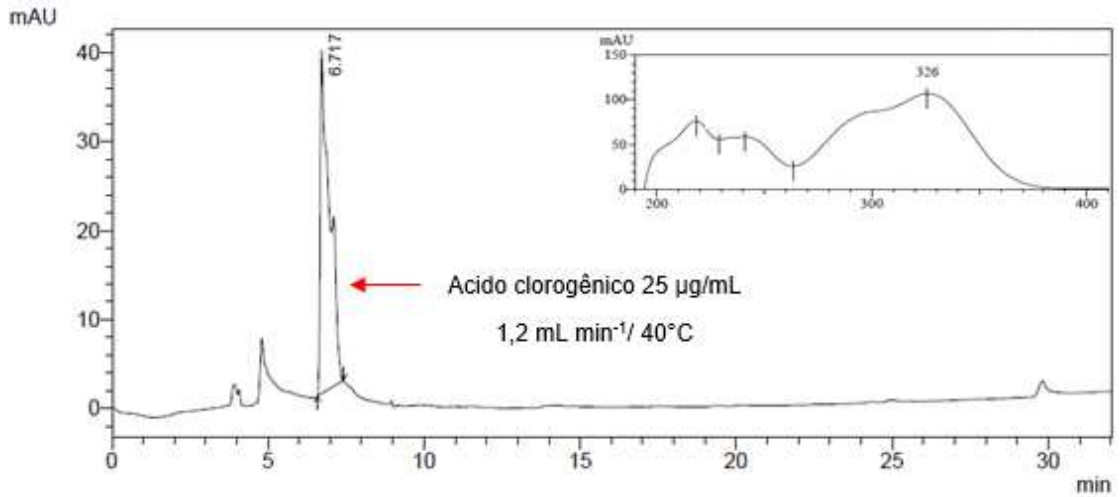
Cromatograma 49: Parâmetro Robustez – Ácido clorogênico 25 µg/mL (0,8 mL min⁻¹/30° C).



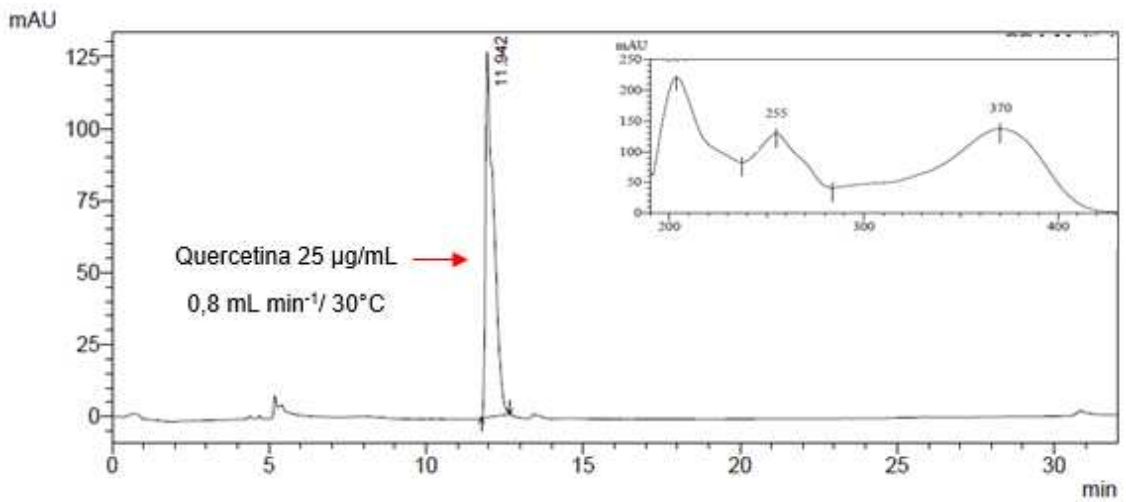
Cromatograma 50: Parâmetro Robustez – Ácido clorogênico 25 µg/mL (0,8 mL min⁻¹/40° C).



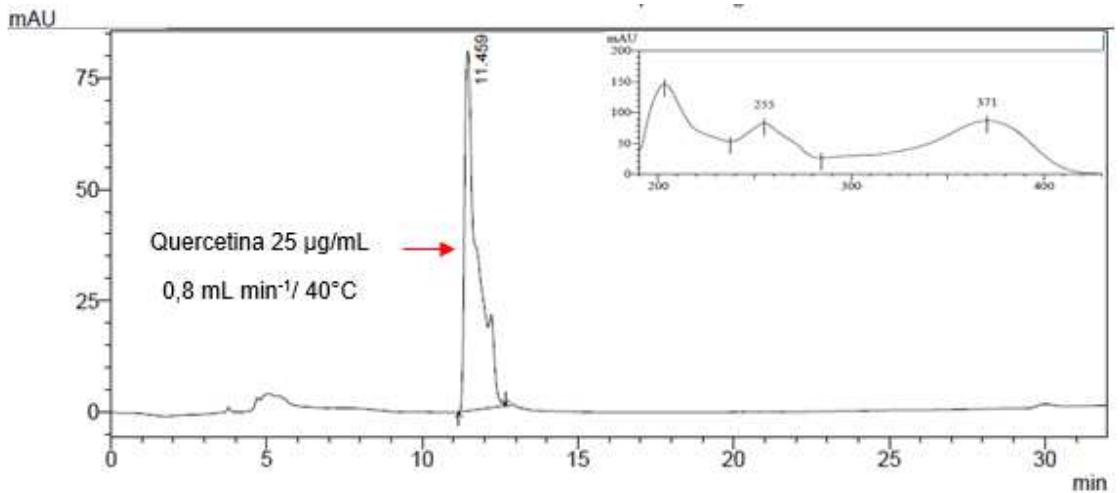
Cromatograma 51: Parâmetro Robustez – Ácido clorogênico 25 µg/mL (1,2 mL min⁻¹/30° C).



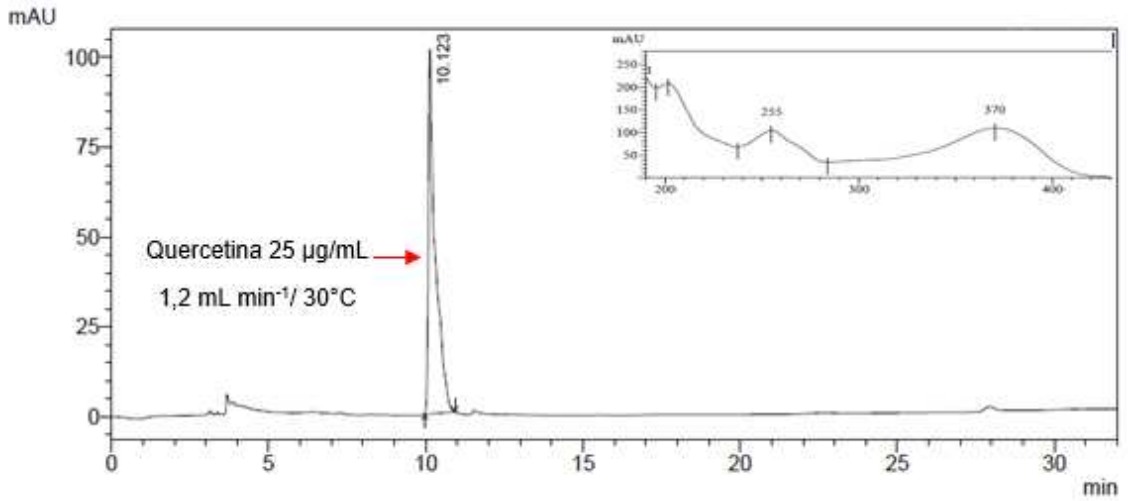
Cromatograma 52: Parâmetro Robustez – Ácido clorogênico 25 µg/mL (1,2 mL min⁻¹/40° C).



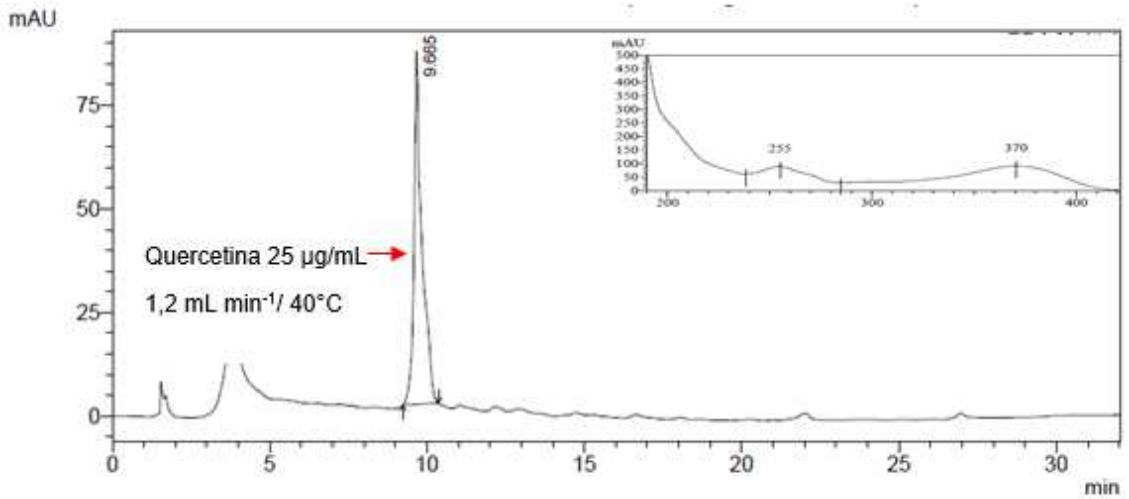
Cromatograma 53: Parâmetro Robustez – Quercetina 25 µg/mL (0,8 mL min⁻¹/30° C).



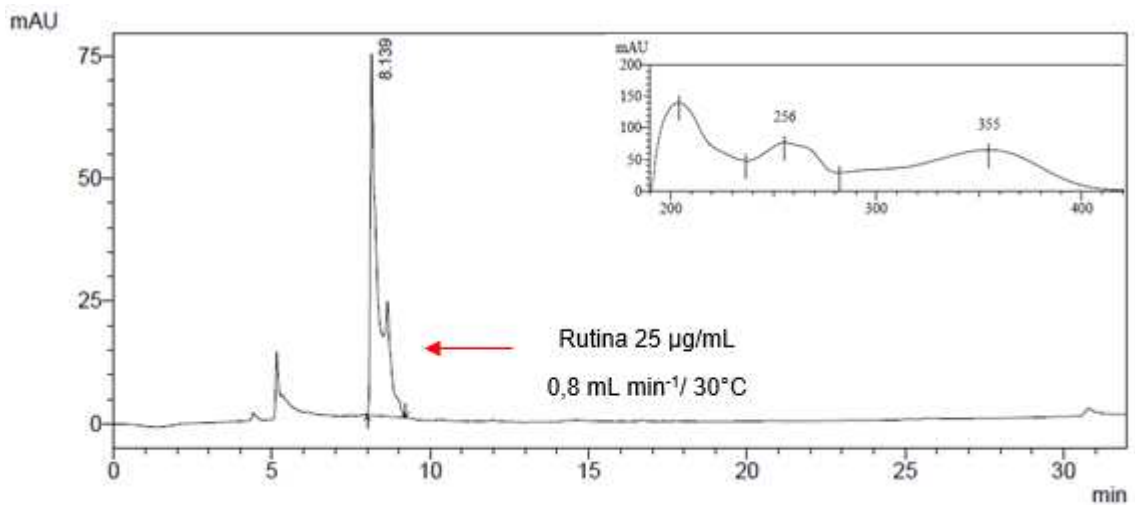
Cromatograma 54: Parâmetro Robustez – Ácido clorogênico 25 µg/mL (0,8 mL min⁻¹/40° C).



Cromatograma 55: Parâmetro Robustez – Quercetina 25 µg/mL (1,2 mL min⁻¹/30° C).

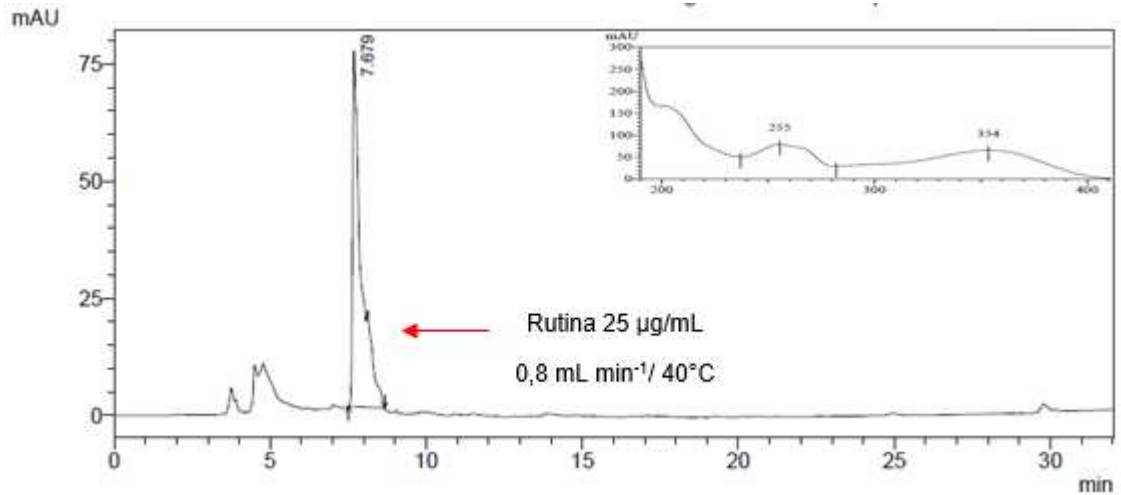


Cromatograma 56: Parâmetro Robustez – Quercetina 25 µg/mL (1,2 mL min⁻¹/40° C).

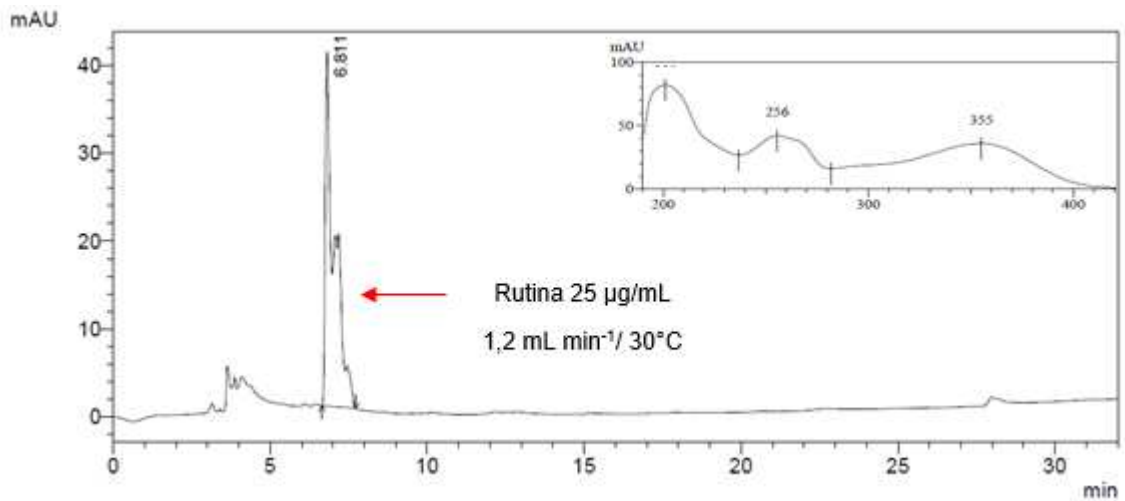


Cromatograma 57: Parâmetro Robustez – Rutina 25 µg/mL

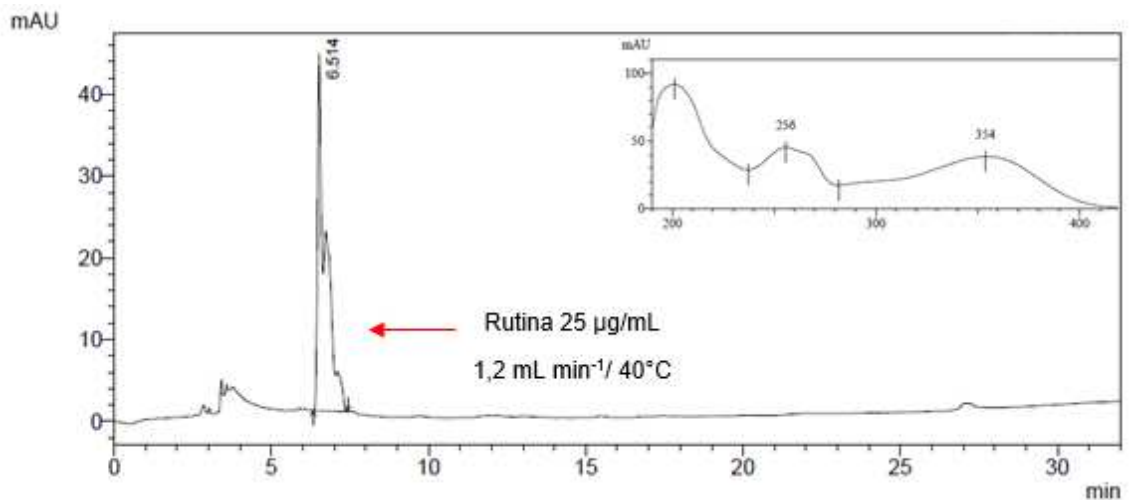
(0,8 mL min⁻¹/30° C).



Cromatograma 58: Parâmetro Robustez – Rutina 25 µg/mL
(0,8 mL min⁻¹/40° C).



Cromatograma 59: Parâmetro Robustez – Rutina 25 µg/mL
(1,2 mL min⁻¹/30° C).



Cromatograma 60: Parâmetro Robustez – Rutina 25 µg/mL.