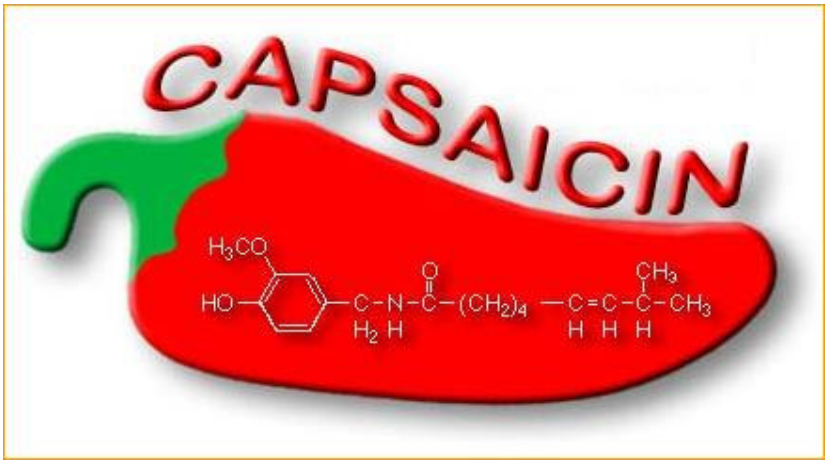
CAPÍTULO 4



EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE CAPSAICINAS EM Capsicum annuum L. EXPLORANDO A DISPERSÃO DE MATRIZ EM FASE SÓLIDA

4.1 – CAPSAICINAS

As espécies de *Capsicum* são conhecidas popularmente como tili, pimenta quente, páprica e pimenta vermelha, sendo utilizadas na alimentação como tempero e corante na indústria. As partes utilizadas de *Capsicum annuum* L., Solanaceae, são os frutos.[1] Os componentes principais são os capsinóides, destacando-se também os carotenóides,[2,3,4] responsáveis pela coloração vermelha, e os lipídeos.[5,6]

Capsinóides são derivativos de compostos fenilpropanóides.[7] Capsaicina e dihidrocapsaicina são os principais componentes fenólicos constituintes de *Capsicum annum*,[8] constituído de 90% ou mais do total de capsinóides. Os outros são nordihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina. As estruturas das principais capsaicinas são mostradas abaixo:

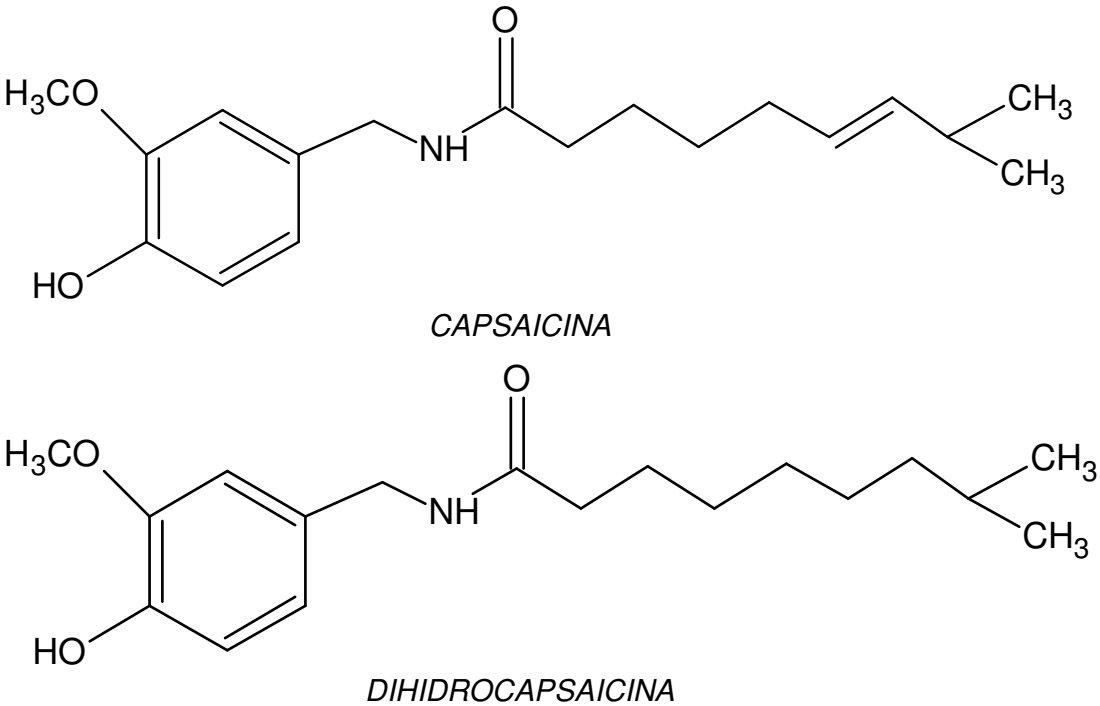


Figura 33 – Estruturas das principais capsaicinas.

Há uma grande diferença no conteúdo e composição de capsinóides em espécies de *Capsicum*, estas diferenças podem estar relacionadas ao clima, luz, solo, fertilização, temperatura durante o crescimento da planta,

condições de secagem. Em geral o teor de capscinóides é de 0,0003-0,01% em *Capsicum anuum*.[9]

De acordo com Estrada *et al.*[10] as diferenças dos teores de capsaicinas estão associadas aos sucessivos estágios de desenvolvimento do fruto. Os níveis de capsinóides foram detectados 14 dias após o florescimento no primeiro estágio, permanecendo por mais 21 dias; após este tempo, no final do desenvolvimento, houve um elevado aumento na quantidade destes compostos.

Os capsinóides são caracterizados pela alta atividade biológica e efeitos farmacológicos e dietéticos. Estudos clínicos têm confirmado que a capsaicina tem propriedades analgésicas quando aplicado topicamente.[11,12,13] O interesse das capsaicinas é baseado em suas propriedades antimutagênicas,[14] seus efeitos no sistema nervoso e, em baixas doses, em seus benefícios nutricional e terapêutico. Capsinóides têm sido usados em loções e como auto-proteção na forma de sprays,[15] pois é um poderoso irritante dos receptores, participando dos reflexos circulatório e respiratório, e é usado também em remédios estimulantes e em preparações de alimentos.[16] Algumas investigações têm sido conduzidas para determinar o potencial mutagênico e carcinogênico[17] das capsaicinas, mas os resultados são discordantes.[18]

A sua importância econômica reside no fato de que em torno de 10.655 toneladas de capsicum, o equivalente a 18,6 milhões de dólares, são importadas pela Alemanha da Hungria e do Mediterrâneo.[19]

4.1.1 - Extração e Análise das Capsaicinas

O método convencional para a determinação de capsinóide é a extração líquido-líquido, seguido por um passo de limpeza de amostra.[13] A farmacopéia prescreve o método de cromatografia líquida para determinar capsaicina e dihidrocapsaicina em produtos brutos e oleoresinas de *Capsicum*.[20] A identificação de capsaicina é feita por cromatografia em camada delgada, de acordo com a USP 2002, sendo que a quantificação das capsaicinas é feita por HPLC.[21]

Laskaridou-Monnerville extraiu capsaicina e dihidrocapsaicina dos frutos de *Capsicum* em metanol, seguido por extração em fase sólida (SPE),

em cartucho C-18, sendo eluída com água e posteriormente com metanol. A recuperação obtida dos padrões de capsaicinas foi de 98%, a análise foi feita por eletroforese capilar.[22]

A cromatografia gasosa (CG) [23] também é usada para quantificação de capsaicinas, sendo que muitos métodos requerem a derivatização para aumentar a volatilidade dos capsinóides. Thomas *et al.* extraíram os capscinóides com acetona e o extrato foi analisado por CG com uma coluna 14% ciano propil fenil / 86% metil, para a interação com o grupo funcional polar da molécula de capsaicina, e injetada diretamente sem a necessidade de derivatização, utilizando detector seletivo termoiônico (TSD) (Termoionic Selective Detector). Em outro trabalho, Hawer *et al.* [24] utilizaram coluna capilar similar ao trabalho de Thomas, necessitando de uma limpeza do extrato antes da injeção, devido o tipo de detector utilizado, que no caso foi o detector de ionização de chama (do inglês Flame Ionization Detector - FID).

Análises de capsaicinas são geralmente realizadas por HPLC, entretanto, esta requer a preparação de amostra para remoção de compostos que podem danificar a coluna.[25] Weaver refluxou a amostra de *Capsicum anuum* em acetona por 1 h, a amostra foi injetada diretamente mas os picos referente às capsaicinas apresentaram coeluição.[26] Betts extraiu a planta com acetona utilizando Soxhlet por 1 h, concentrando em rotaevaporador, redissolvendo em etanol, foi retirado uma pequena alíquota da amostra e novamente dissolvendo na fase móvel. Foi também testado extração por SPE, sendo que o cromatograma apresentou picos de capsaicinas deformados.[27] A separação também foi apresentada utilizando detector de fluorescência.[28] No manual Niosh, a extração foi realizada com etanol a quente, entretanto os picos apresentados foram praticamente indistinguíveis da linha de base.[29] A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, também foi usada para análise de capsaicinas.[30]

Para análise espectrofotométrica, os capsinóides foram extraídos da planta com uma mistura de éter de petróleo/acetona e separados utilizando cromatografia em camada delgada em sílica gel, sendo que a análise foi realizada em comprimento de onda de 590 nm.[31]

Topuz *et al.* extraíram os capsinóides em *Capsicum anuum* com ACN, aquecendo a 80° C por 4 h, sendo a análise realizada por HPLC.[9]

A eficiência da extração das capsaicinas foi estudada por fluido super crítico[16,32,33,34,35] sendo que os rendimentos apresentados nos trabalhos foram comparáveis aos extratos obtidos com solvente orgânicos sob refluxo, as análises foram realizadas por HPLC.

4.2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi explorar a extração de capsaicinas por dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), utilizando como técnica analítica a eletroforese capilar.

4.3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 - Materiais e Método

4.3.1.1- Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento para eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector de arranjo de diodos, em 200 nm, mantido a 35 ^{o}C, tratamento e aquisição de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

As amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente a 40 mbar durante 3 s e o sistema foi operado em polaridade normal com tensão constante a 18 kV. Um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo e 75 μm d.i., 375 μm d.e. foi usado para as análises. No início de cada dia o capilar foi condicionado com 1,0 mol L^{-1} NaOH (5 min), seguido por 5 min de água desionizada e eletrólito (30 min). Entre as corridas o capilar foi também lavado com eletrólito por 2 min.

4.3.1.2 – Reagentes, Padrões e Soluções

Todos os reagentes foram de grau analítico, os solventes foram de grau cromatográfico e água purificada por desionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Soluções estoque de padrões de capsaicina e dihidrocapsaicina da Sigma-Aldrich (Milwalkee, E.U.A.) foram preparadas

em concentração de 1000 μg mL^{-1} em etanol, estocadas a 4° C e usadas após adequada dissolução.

O eletrólito usado para quantificação e validação do método foi constituído de 10 mmol L^{-1} TBS, 10 mmol L^{-1} SDS e 10% ACN.

4.3.1.3 - Amostra e Seu Preparo

Os frutos secos de *Capsicum anuum* L. foram obtidos da marca Quimer Ltda (São Paulo, SP).

Os sorventes avaliados foram Florisil da marca Sigma – Aldrich (150 μm), Sílica de 60 mesh (0,063 – 0,2 mm) da marca Merck e Octadecilsílica (C-18) da marca Labtron, Strata C-18E (50 μm, 70 ângstrons).

Sílica e Florisil foram eluidos com o mesmo sistema de solventes por serem fases polares (misturas de 15% Acetato de etila/ 85% Hexano, 96% Diclorometano/ 4% Metanol, 80% Diclorometano/ 20% Hexano, 70% Tolueno/ 30% ACN). Para C-18, o condicionamento e a eluição dos capsinóides foram realizados com ACN pura.

A extração por MSPD foi realizada da seguinte forma: para cada sorvente testado foram usados 2 g de planta seca que foram homogeneizados com 4 g de sorvente, macerando com o auxílio de um pistilo e almofariz por aproximadamente 2 min.

Uma coluna de vidro (25 cm x 1,0 cm) foi fabricada com uma torneira, contendo vidro sinterizado de 0,3 mm, próximo ao final da coluna.

Foram colocados, em camadas, na coluna de vidro: um chumaço de lã de vidro compactado, seguido de 1 g de sorvente que foi condicionado com o eluente no volume de 10 mL. Em seguida, foi colocada novamente lã de vidro, seguida da amostra (planta e o sorvente macerados), finalmente adicionou-se aproximadamente 1 g de sulfato de sódio, cobrindo-se com lã de vidro. O conteúdo da coluna foi pressionado levemente com o auxílio de um bastão de vidro. A eluição foi feita com 15 mL do eluente. O extrato preparado foi posteriormente dissolvido na proporção 1:10, sendo dissolvidos no próprio solvente (acetonitrila pura), em concentrações variadas de TBS (10 a 30 mmol L^{-1}) e SDS (10 a 30 mmol L^{-1}).

4.3.2 - Validação

4.3.2.1 - Linearidade: Para a obtenção da curva analítica seis concentrações dos padrões foram preparadas na faixa de 1,6 a 50 μg mL^{-1}, sendo que foram realizadas análises em triplicata para cada ponto. LOQ e LOD foram calculados para a concentração que fornece sinal/ruído igual a 10 e 3, respectivamente.

4.3.2.2 - Precisão: A precisão foi avaliada pela repetibilidade no próprio dia e precisão intermediária, entre dias. A repetibilidade foi avaliada a partir dos resultados do coeficiente de variação de cada solução padrão de capsaicina na concentração de 100 μg mL^{-1}, cada um, após 5 injeções consecutivas. A precisão intermediária foi obtida em 2 dias, desde a extração da amostra, análises em triplicatas foram realizadas.

4.3.2.3 - Exatidão: A exatidão foi expressa como porcentagem de recuperação. Para o estudo de recuperação foi realizada a adição de padrão das capsaicinas de concentração conhecida na amostra, preparada pelo processo de MSPD, conforme procedimento acima. Os extratos foram diluídos em TBS 20 mmol L^{-1}.

4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho um método rápido baseado em MEKC foi desenvolvido para a determinação de capsinóide em *Capsicum anuum*. As condições de separação foram avaliadas na própria amostra (extrato obtido em Florisil), uma vez que a separação dos padrões de capsaicinas estava bem estabelecida em várias condições.

Parâmetros instrumentais e analíticos foram avaliados.

4.4.1 - Otimização das Condições de Separação

4.4.1.1 - Otimização da Composição do Eletrólito de Corrida

4.4.1.1.1 - Efeito da Concentração de SDS

Testes preliminares, na própria planta (extrato de *Capsicum* obtido por MSPD), foram conduzidos onde a concentração de TBS foi mantida constante no valor de 10 mmol L^{-1} e a concentração de SDS foi variada de 10 a 40 mmol L^{-1}. Ao aumentar a concentração de SDS aumentava-se o tempo de migração das capsaicinas e a diminuição da resolução dos componentes da amostra, provavelmente devido ao efeito de interação das capsaicinas com as micelas, conforme Figura 34. Maiores concentrações de SDS não foram testadas devido ao aumento excessivo da corrente gerada.

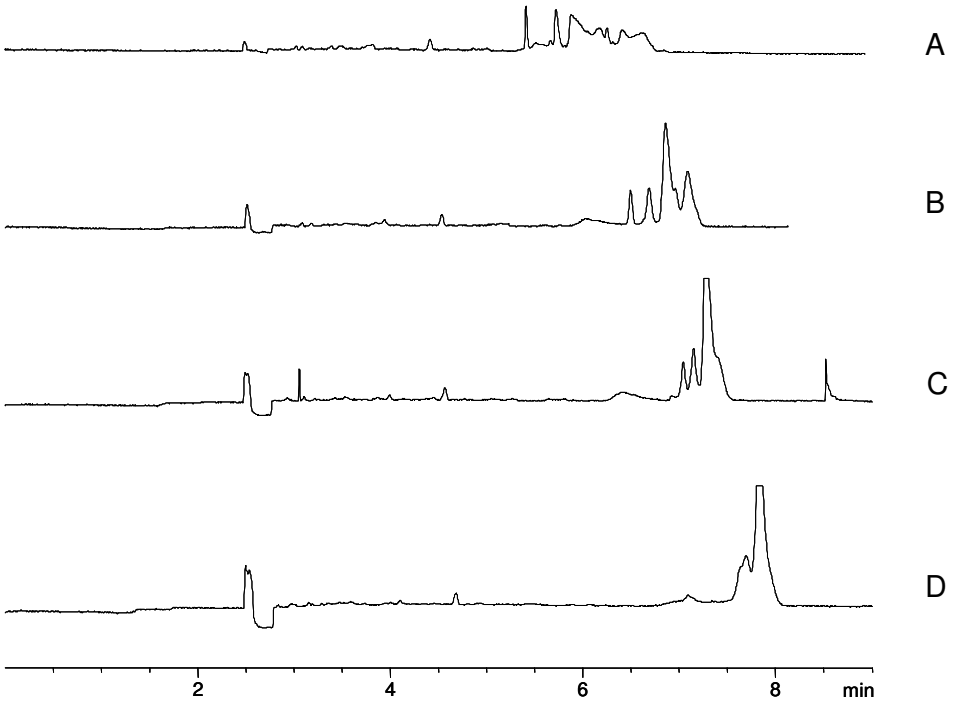


Figura 34 – Variação da concentração de SDS no eletrólito. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20° C, 20 kV, 200 nm, tampão 10 mmol L^{-1} TBS. (A) 10 mmol L^{-1} (B) 20 mmol L^{-1} (C) 30 mmol L^{-1} (D) 40 mmol L^{-1}. Extrato de *Capsicum* obtido por MSPD.

4.4.1.1.2 - Efeito da Adição de SDS em Eletrólito Contendo 5% e 10% de ACN

O parâmetro de maior influência na separação dos componentes de *Capsicum* foi a adição de ACN ao eletrólito. ACN foi adicionada a 5 e 10%, variando-se a concentração de SDS de 10-30 mmol L^{-1}. Aumentando-se a concentração de ACN resultou no melhoramento da separação, isto pode ser explicado pois alguns solventes tendem a aumentar a viscosidade do eletrólito dentro da coluna, reduzindo o fluxo.[36] O compromisso entre boa separação e menor tempo de migração foi obtido com a porcentagem de 10% de ACN, 10 mmol L^{-1} TBS e 10 mmol L^{-1} SDS, com bom tempo de migração e resolução entre os componentes da amostra (extrato de *Capsicum* obtido por MSPD), conforme mostram Figuras 35 e 36 apresentadas abaixo.

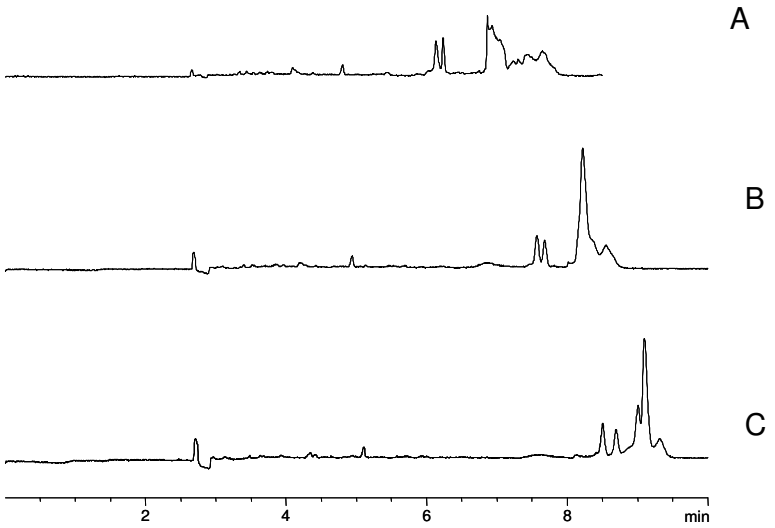


Figura 35 – Efeito da adição de SDS, contendo 5% ACN no eletrólito. Eletrólito: 10 mmol L^{-1} TBS. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20 °C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 10 mmol L^{-1} SDS (B) 20 mmol L^{-1} SDS (C) 30 mmol L^{-1} SDS. Extrato de *Capsicum* obtido por MSPD.

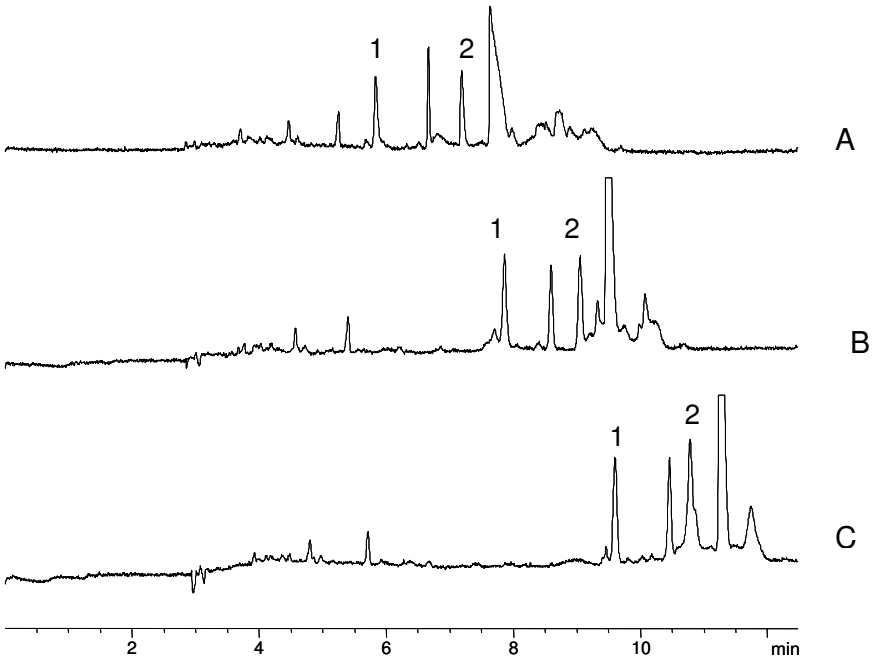


Figura 36 – Efeito da adição de SDS contendo 10% de ACN no eletrólito. Eletrólito: 10 mmol L^{-1} TBS. Capilar 48,5 cm x 75 µm, injeção hidrodinâmica 40 mbar por 3 s, temperatura: 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 10 mmol L^{-1} SDS (B) 20 mmol L^{-1} SDS (C) 30 mmol L^{-1} SDS. 1 – Capsaicina 2 – Dihidrocapsaicina. Extrato de *Capsicum* obtido por MSPD.

4.4.1.2 - Otimização dos Parâmetros Instrumentais

4.4.1.2.1 - Escolha da Tensão

A tensão foi avaliada entre 15-30 kV. A melhor tensão foi estabelecida em 20 kV, na qual não se notou processo de dispersão acentuada de banda, um tempo curto de análise com a resolução dos componentes da amostra, conforme Figura 37. A tensão de 30 kV não foi escolhida devido a coeluição de um componente da planta não identificado próximo da capsaicina.

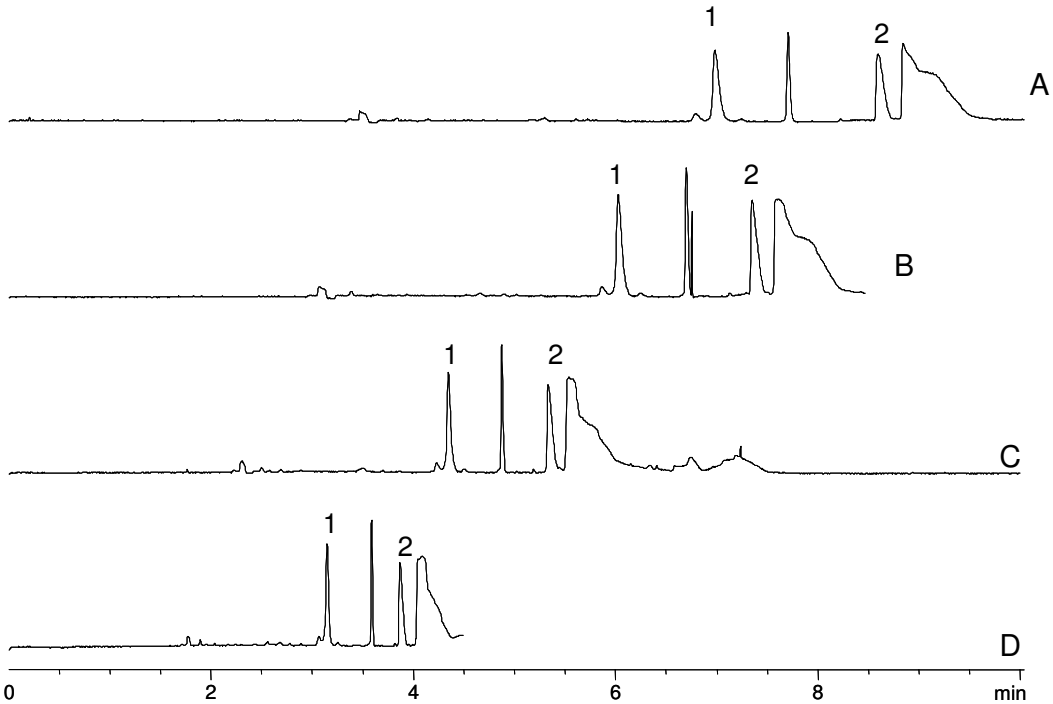


Figura 37 – Escolha da tensão. Capilar 48,5 cm x 75 µm. Eletrólito: 10 mmol L^{-1} TBS, 10 mmol L^{-1} SDS, 10% ACN. injeção hidrodinâmica 40 mbar por 3 s, temperatura: 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 15 (B) 20 (C) 25 (D) 30 kV. 1 – Capsaicina 2 – Dihidrocapsaicina. Extrato de *Capsicum* obtido por MSPD.

4.4.1.2.2 - Escolha da Temperatura

A temperatura foi variada entre 20 a 35° C. A temperatura de 35° C proporcionou maior resolução e maior intensidade de sinal e eficiência, conforme Figura 38. O maior uso da temperatura aumenta a velocidade de separação dos componentes devido a diminuição da viscosidade do eletrólito.

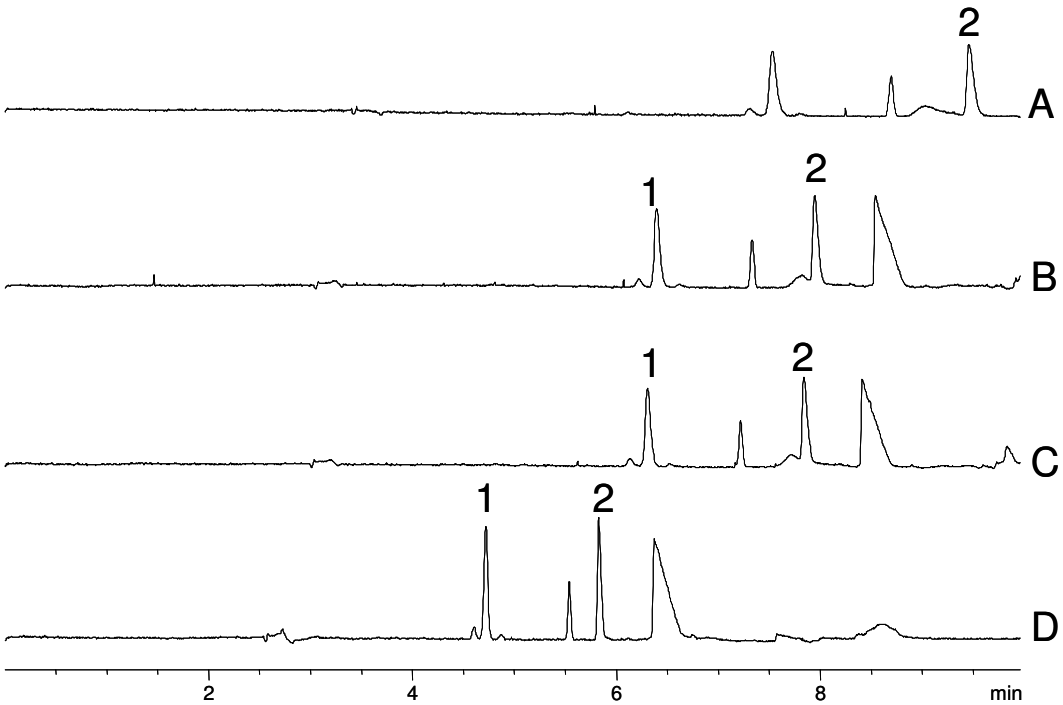


Figura 38 - Escolha da temperatura de separação. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, temperatura: 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 20 (B) 25 (C) 30 (D) 35 ^{o}C. 1 – Capsaicina 2 – Dihidrocapsaicina. Extrato de *Capsicum* obtido por Soxhlet, 8 h.

Os seguintes parâmetros instrumentais foram escolhidos para a separação dos componentes de *Capsicum*: capilar 48,5 cm x 75 µm, injeção hidrodinâmica 40 mbar por 3 s, temperatura: 35 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm, em eletrólito constituído de 10 mmol L^{-1} de TBS, 10 mmol L^{-1} de SDS e10% de ACN.

Com o método de separação estabelecido, partiu-se para a otimização de extração de *Capsicum*.

4.4.2 - Otimização da Extração por MSPD

4.4.2.1 - Escolha do Sorvente

Diferentes fases sólidas foram testadas seguindo o procedimento 4.3.3.3. Foram usados como suporte para a dispersão da matriz o Florisil, que consiste de uma mistura de óxido de magnésio (15,5%), dióxido de silício (84%) e sulfato de sódio (0,5%), Octadecilsílica e Sílica, portanto,

foram avaliadas duas colunas polares e uma apolar. Verificou-se que todas as colunas apresentaram bons resultados, com a separação dos componentes da amostra, entretanto, o sorvente que apresentou melhor resultado foi Florisil, usando DCM/MeOH como solvente de eluição, conforme apresentado na Figura 39. De todas as fases testadas, Florisil providenciou maior extração, em termos de área de capsaicina e dihidrocapsaicina, apresentado na Figura 40, sendo também o preferido para a extração por MSPD pela obtenção de extratos limpos.

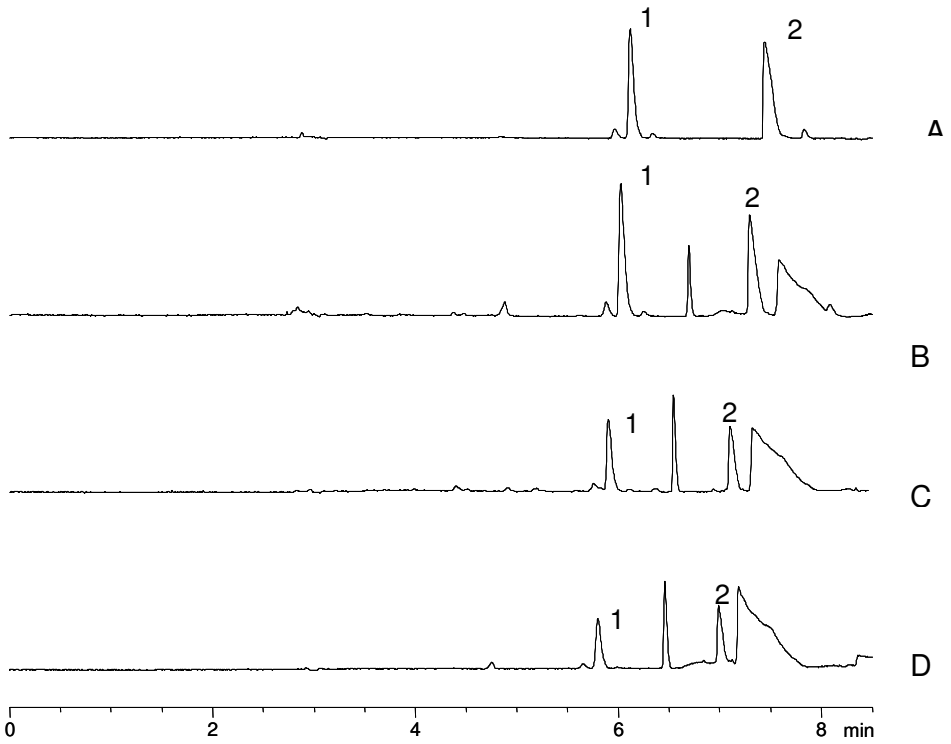


Figura 39 – Otimização de sorventes por MSPD. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20 °C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) padrões de capsaicinas (B) Florisil (C) C-18 (D) sílica. (1) Capsaicina (2) Dihidrocapsaicina

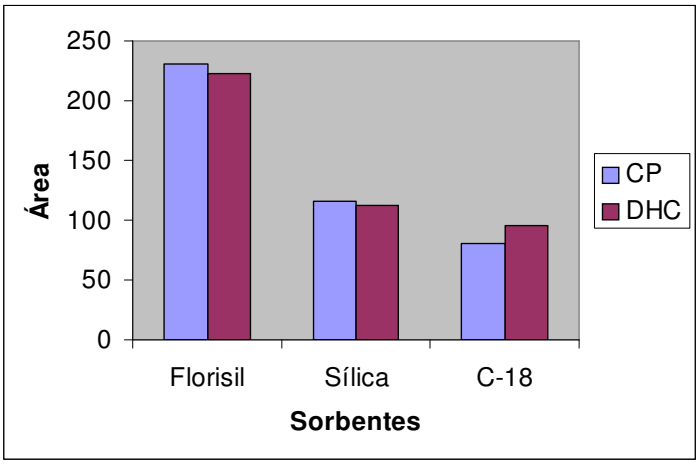


Figura 40 – Escolha do sorvente. CP = capsaicina, DHC = dihidrocapsaicina.

4.4.2.2 - Escolha do Solvente de Eluição em MSPD

Após a escolha do Florisil como sorvente, o passo seguinte foi a escolha do solvente de eluição mais adequado para a extração.

O volume do eluente foi estipulado em 15 mL, conforme literatura, este volume é conveniente para extração por MSPD.

Diferentes solventes para eluição foram avaliados seguindo literatura:[37] acetato de etila/hexano (15:85), diclorometano/metanol (96:4), diclorometano/n-hexano (80:20), tolueno/acetonitrila (70:30). Utilizando diclorometano/n-hexano como solvente de eluição não se verificou a presença dos componentes da amostra, a melhor recuperação, utilizando Florisil como sorvente, foi obtida eluindo a amostra com diclorometano/metanol, conforme Figuras 41 e 42, mostrando os eletroferogramas com os eluentes testados e as respectivas áreas de capscinóides em *Capsicum*, respectivamente.

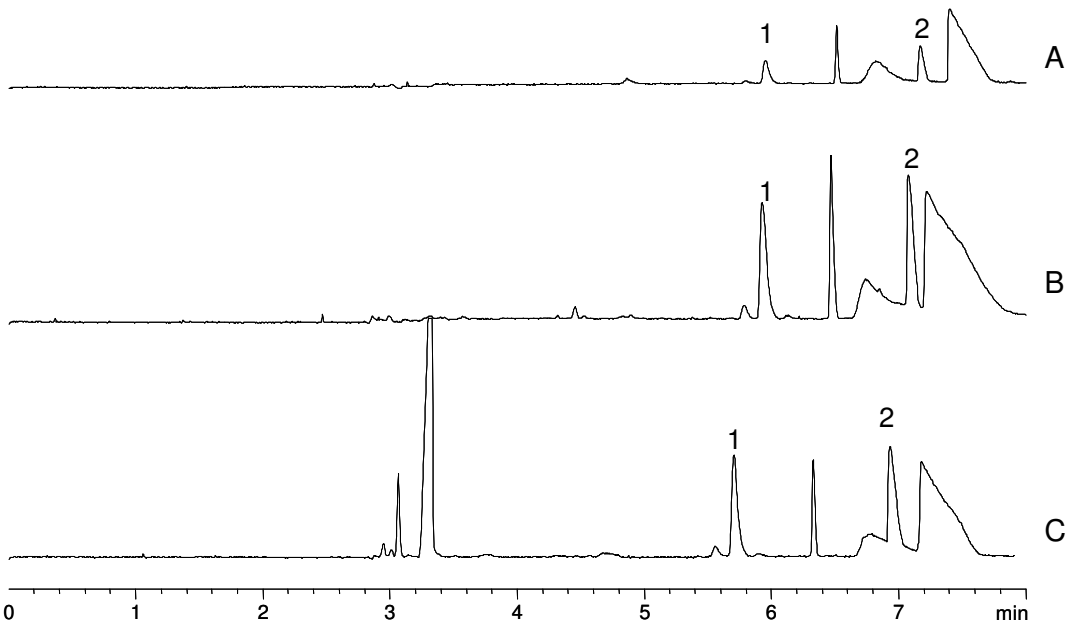


Figura 41 - Escolha do solvente de eluição. Capilar 48,5 cm x 75 µm, injeção hidrodinâmica 40 mbar por 3 s, temperatura: 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) acetato/hexano (15:85) (B) CH_2Cl_2/MeOH (96:4) (C) tolueno/ACN (70:30). (1) Capsaicina (2) Dihidrocapsaicina

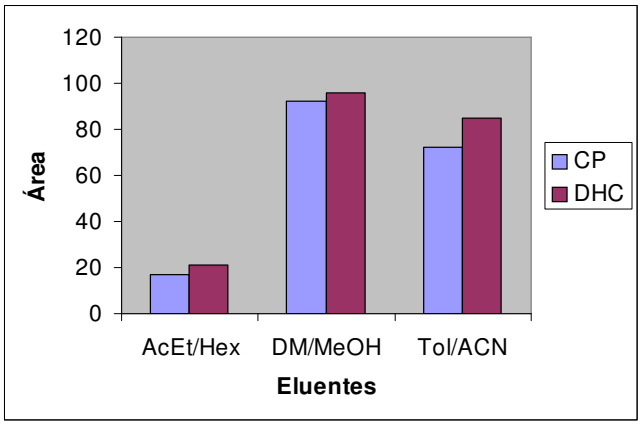


Figura 42 – Escolha do eluente usando Florisil como sorvente. CP = capsaicina e DHP = dihidrocapsaicina

4.4.2.3 - Diluição da amostra

A diluição do extrato após MSPD foi primeiramente avaliada em 1:10 ACN (v:v) o qual verificou picos mal formados devido provavelmente ao rompimento das micelas de SDS do eletrólito de corrida. Foram posteriormente avaliados a diluição em TBS em diferentes concentrações de 10-30 mmol L^{-1} e em SDS de 10-30 mmol L^{-1}. Com a diluição em SDS verificou-se picos arredondados com a conseqüente perda de resolução com o aumento da concentração de SDS. Com a diminuição de TBS verificou-se a aproximação dos picos da dihidrocapsaicina com o outro componente da amostra não identificado. A concentração de 20 mmol L^{-1} de TBS, como meio de dissolução dos extratos, foi aceita por fornecer a melhor resolução entre os componentes da amostra (Figuras 43, 44 e 45).

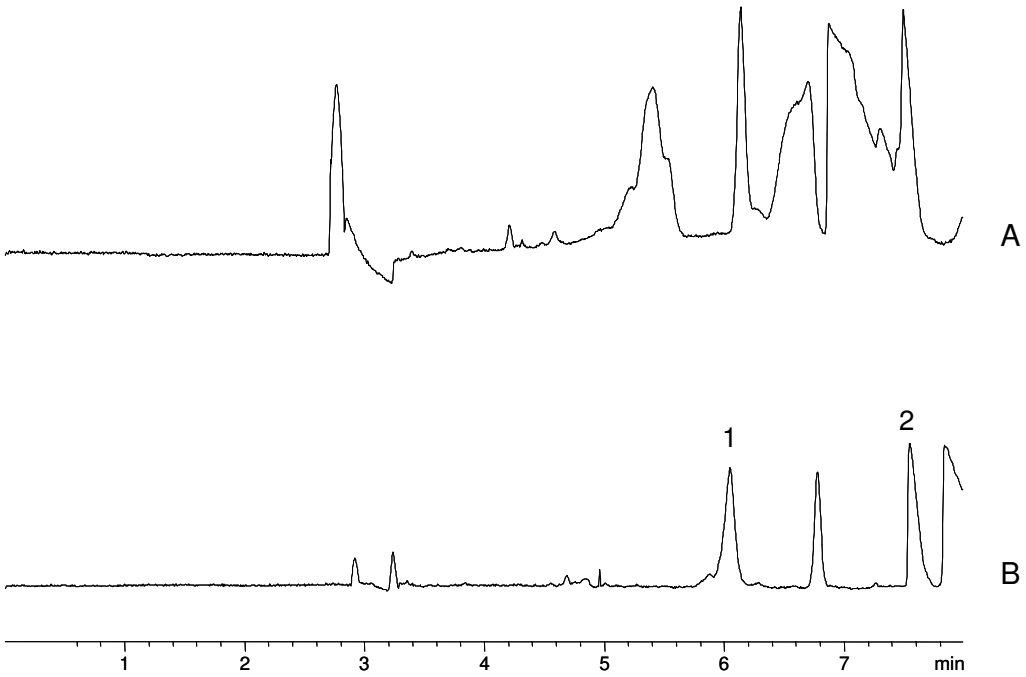


Figura 43 - Diluição da amostra em solvente e no eletrólito de corrida. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20 °C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 1:10 ACN (B) 1:10 eletrólito de corrida. (1) Capsaicina (2) Dihidrocapsaicina

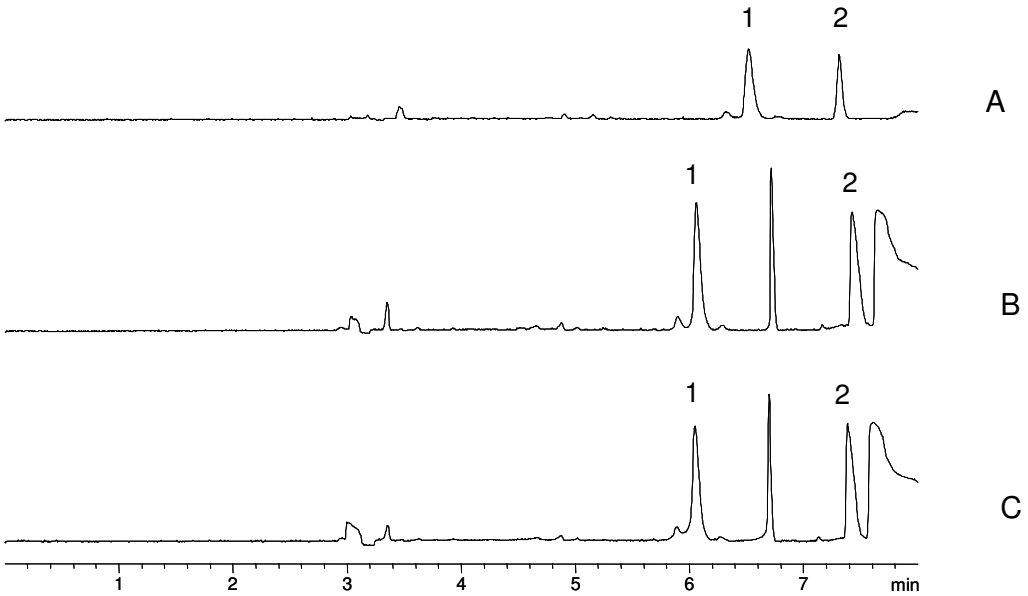


Figura 44 - Diluição da amostra em diferentes concentrações de TBS. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 10 mmol L^{-1} (B) 20 mmol L^{-1} (C) 30 mmol L^{-1}. (1) Capsaicina (2) Dihidrocapsaicina

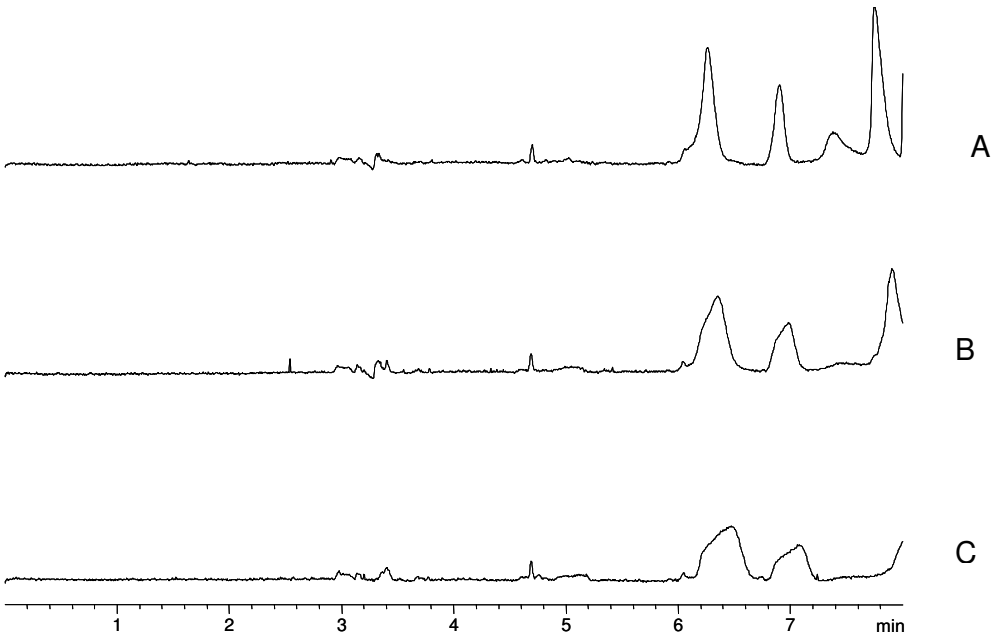


Figura 45 - Diluição da amostra em diferentes concentrações de SDS. Capilar 48,5 cm x 75 µm, 40 mbar por 3 s, 20 ^{o}C, tensão: 20 kV, 200 nm. (A) 10 mmol L^{-1} (B) 20 mmol L^{-1} (C) 30 mmol L^{-1}.

As condições otimizadas de extração de *Capsicum anuum* por MSPD foram: proporção de planta:solvente de 1:2, Florisil como sorvente, solvente de eluição de DCM / MeOH na proporção de 96:4 em volume de 15 mL e diluição da amostra após extração em 20 mmol L^{-1} de TBS.

4.4.3 - Validação

4.4.3.1 - Linearidade

Excelente linearidade foi obtida na faixa de concentração estudada de 6,25 a 100 µg mL^{-1}, com coeficiente de correlação de 0,9998 e 0,999 para CAPS e DHC, respectivamente, conforme Tabela 24.

Tabela 24 - Valores de coeficiente de determinação, LOD e LOQ

Compostos	r^2	LOD (µg mL^{-1}) *	LOQ (µg mL^{-1})
Capsaicina	0,9998	1,97	3,95
Dihidrocapsaicina	0,9999	1,10	3,31

Intervalo de concentração: 6,25 – 100 µg mL^{-1}
* Relação sinal ruído igual a 3.

4.4.3.2 - Precisão

A repetibilidade instrumental foi avaliada para 5 corridas das soluções padrão das capsaicinas, apresentada na Tabela 25. A Tabela 26 apresenta os valores de precisão intermediária em 2 dias, análise em triplicata.

Tabela 25 - Valores intra ensaio.

Compostos	CV da área(%)
Capsaicina	1,7
Dihidrocapsaicina	1,9

n = 5

Tabela 26 - Valores inter ensaio.

Compostos	Concentração (µg mL^{-1})	CV da área(%)
Capsaicina	12,6	0,42
Dihidrocapsaicina	16,0	1,5

n = 6

4.4.3.3 - Exatidão

A Tabela 27 sumariza a recuperação apresentando ótimos valores, na faixa de 99%.

Tabela 27 – Valores de recuperação.

Compostos	Recuperação (%)
Capsaicina	99,3
Dihidrocapsaicina	99,1

n = 9

4.5 - CONCLUSÕES

O método proposto de extração de capsaicinas por MSPD oferece baixo tempo de extração, é simples, requer pequena quantidade de amostra e baixo consumo de solvente. O tempo aproximado para a realização do procedimento por MSPD é de 30 min, entre a homogeneização com o sorvente até a eluição.

A MEKC foi desenvolvida para a determinação de capsaicina e dihidrocapsaicina em tempo de separação total de 7,5 min, apresentando boa linearidade do método, com R^2 em torno de 0,999, para as duas capsaicinas, boa resolução entre os componentes da amostra e recuperação dos capscinóides em torno de 99%.

4.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - TESKE, M., TREBTINI, A.M.M., *Herbarium - Compêndio de Fitoterapia*, 2.ed., Curitiba,1995.

2 - OLIVER, J.; PALOU, A., *J. Chromatogr.A*, v.881, p.543-555, 2000.

3 - BREITHAUPT, D.E.; SCHWACK, W*, Eur. Food Res. Technol.*, v.211, p.52-55, 2000.

4 - KISS, G.A.C.; FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T.; MOTA, T.; MORAIS, H.; RAMOS, A., *J. Chromatogr. A*, v.889, p.41-49, 2000.

5 - ASILBEKOVA, D.T., *Chem. Nat. Compd.,* v.39, n.5, p.442 – 445, 2003.

6 - ORHAN, I.; ERYILMAZ, B.; BINGOL, F., *Biochem. Syst. Ecol.*, v.30, p.901-904, 2002.

7 - SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; Petrovick, P.R., *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 5.ed., Porto Alegre / Florianópolis, editora da UFSC/ UFRGS, 2003.

8 - SHOU, S., *Life Sci.*, v.74, p.935-968, 2004.

9 - TOPUZ, A.; OZDEMIR, F., *Food Chem.,* p.509-515, 2004.

10 - ESTRADA, B.; BERNAL, M.A.; DIAZ, J.; POMAR, F.; MERINO, F., *J. Agric. Food Chem.,* v.48, p.6234-6239, 2000.

11 - MCCLEANE G., *Eur. J. Pain,* v.4, p.355-360, 2000.

12- *Prepared Foods*, Sept., 2002.

13 - KAALE, E.; SCHEPDAEL, A,V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J., *J. Pharm. Biomed. Anal.,* v.30, p.1331-1337, 2002.

14 - HAMSS.R.E.L.; IDAOMAR, M.; ALONSO-MORAGA, A.; SERRANO, A.M., *Food Chem. Tox.,* v.41, p.41-47, 2003.

15 - REILLY, C.A.; CROUCH, D.J.; YOST, G.S.; FATAH, A.A., *J. Chromatogr. A*, v.912, p.259-267, 2001.

16 - PERVA-UZUNALIÉ, A.; SKERGET, M.; WEINREICH, B.; KNEZ, Z.; *Food Chem.*, v.87, p.51-58, 2004.

17 - ARCHER, V.E.; JONES, D.W., *Med. Hypotheses*, v.59, n.4, p.450-457, 2002.

18 - SURH, Y-H.; LEE, S.S., *Fd. Chem. Toxic.* v.34, n.3, p.313-316, 1996.

19 - RAMESH, M.N.; WOLF, W.; TEVINI, D.; JUNG, G., *J. Food Eng.,* v.49, p.63-72, 2001.

20 - KAALE, E.; SCHEPDAEL, A.V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J., *J. Pharm. Biom. Anal.,* v.30, p.1331-1337, 2002.

21 - United States Pharmacopoeia 26.ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2003.

22 - LASKARIDOU-MONNERVILLE, A., J. *Chromatogr. A*, v.838, p.293-302, 1999.

23 - THOMAS, B.V.; SCHREIBER, A.A.; WEISSKOPF, C.P., *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p.2655, 1998.

24 - HAWER, W.; HA, J.; HWANG, J.; NAM, Y., *Food Chem.*, v.49, p.99-103, 1994.

25 - CATCHPOLE, O.J.; GREY, J.B.; PERRY, N.B.; BURGESS, E.J.; REDMOND, W.A.; PORTER, N.G., *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.4853-4860, 2003.

26 - WEAVER, K.M.; AWDE, D.B., *J. Chromatogr. A*, v.367, p.438-442, 1986.

27 - BETTS, T.A., *J.Chem. Educ.*, v.76, n.2, p.240-244, 1999.

28 - *CH3&6K Analytical Chemistry Manual*, Feb 10 th, p.46-57, 2003.

29 - *NIOSH Manual of Analytical Methods*, 4 th, 15/05/1996, METHOD 5041.

30 - *LC-MS Application Data Sheet* nº 028 Shimadzu.

31 - PERUCKA, I.; OLESZEK, W., *Food Chem.*, v.71, p.287-291, 2000.

32 - DAOOD, H.G.; ILLÉS, V.; GNAYFEED, M.H.; MESZAROS, B.; HORVÁTH, G.; BIACS, P.A., *J. Supercrit. Fluids*, v.23, p.143-152, 2002.

33 - DUARTE, C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; GOUVEIA, A.F.; COSTA, S.B.; LEITÃO, E.; BERNARDO-GIL, G., *J. Supercrit. Fluids*, v.30, p.155-161, 2004.

34 - GNAYFEED, M.H.; DAOOD, H.G.; ILLÉS, V.; BIACS, P.A., *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p.2761-2766, 2001.

35 - YAO, J.; NAIR, M.G.; CHANDRA, A., *J. Agric. Food Chem.*, v.42, p.1303-1305, 1994.

36 - WEINBERGER, R., *Practical Capillary Electrophoresis*, Nova York, Academic Press Inc.

37 - NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L.; POLESE L.; BARCELÓ, D.; *J. Chromatogr. A*, v.795, p.43-51, 1998.