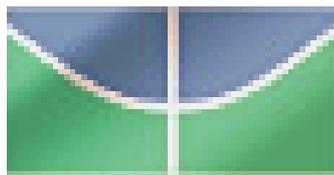


**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

JOSÉ GETÚLIO DA SILVA FILHO

**Diversidade dos Pigmentos e do Gene Codificador da Capsantina-
Capsorubina Sintase (Via Biossintética dos Carotenóides) em
Quatro Espécies do Gênero *Capsicum* L.**

**Brasília-DF
Agosto de 2010**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

JOSÉ GETÚLIO DA SILVA FILHO

**Diversidade dos Pigmentos e do Gene Codificador da Capsantina-
Capsorubina Sintase (Via Biossintética dos Carotenóides) em
Quatro Espécies do Gênero *Capsicum* L.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Botânica.

**Brasília-DF
Agosto de 2010**

Termo de Aprovação

Diversidade dos Pigmentos e do Gene Codificador da Capsantina-capsorubina sintase (Via Biossintética dos Carotenóides) em Quatro Espécies do Gênero *Capsicum* L.

Dissertação aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre, pelo Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Membros da Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos Torres

Orientador

Prof^a Dr.^a Lourdes Isabel Velho do Amaral

Membro interno

Dr.^a Maria Esther de Noronha Fonseca

Membro Externo

Dr. Leonardo Silva Boiteux

Suplente

Brasília - DF, 20 de Agosto de 2010

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam no meu potencial, e a minha esposa e a meus filhos, a quem sempre acreditou em mim e me encorajaram sempre.

“O fundamental para termos confiança em qualquer campo da vida está na preparação”

Brian Tracy

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me guiar no caminho do conhecimento;

À Minha esposa e aos meus filhos por compreenderem a importância da busca do conhecimento, sempre com confiança e estímulo;

Aos meus pais que sempre viram os estudos como uma área de progresso e me incentivaram neste caminho;

À Embrapa Hortaliças pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos;

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Torres, pela orientação e confiança e por ter me guiado de forma a adquirir experiência e profissionalismo;

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças Dr. Leonardo Silva Boiteux e Dra. Maria Esther de Noronha Fonseca, pelos seus ensinamentos e contribuição para o meu Trabalho;

A Pesquisadora da Embrapa Cenargen, Dra. Tânia Agostini, por me ajudar na identificação dos carotenóides;

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento Vegetal da Embrapa Hortaliças, Antonio Francisco Costa (Chico Bucha), William Pereira Dutra e ao Claudemir (Toquinho) que me ajudaram nos trabalhos de laboratório e casa de vegetação.

Aos colegas da Universidade, pelo companheirismo e amizade durante o curso

Aos meus familiares que se privaram da minha companhia neste período do curso.

RESUMO

Os Carotenóides são compostos naturais que apresentam papéis fisiológicos cruciais nas plantas e que possuem importantes funções nutricionais e nutracêuticos na dieta de seres humanos e animais. Os frutos maduros de *Capsicum* apresentam uma gama de colorações incluindo vermelho intenso, laranja, amarelo e marrom que são condicionadas pela presença de distintos pigmentos carotenóides. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a diversidade de compostos carotenóides em frutos maduros de 20 acessos de quatro espécies do gênero *Capsicum*. Os acessos de frutos maduros amarelos apresentaram maior quantidade dos pigmentos luteína e violaxantina. Os acessos de frutos de coloração alaranjada apresentaram como principal pigmento o α -caroteno. Os frutos vermelhos apresentaram capsantina/capsorubina como os principais pigmentos. Uma exceção foi o acesso de fruto vermelho 'Majjorca' que apresentou maior quantidade de β -caroteno em relação à capsantina/capsorubina. Um acesso de *C. chinense* com coloração marrom foi o único que acumulou clorofila no fruto maduro. A diversidade de pigmentos encontrada indica que é possível aumentar (via melhoramento clássico) o conteúdo e o repertório destes carotenóides com funções nutricionais/nutracêuticas nos frutos de *Capsicum*. Genes codificadores de enzimas da via biossintética dos carotenóides têm sido analisados como potenciais marcadores funcionais para a característica cor de fruto em *C. annuum*. O gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase tem sido um dos principais alvos destes estudos uma vez que esta enzima está envolvida na síntese dos principais pigmentos relacionados com a típica coloração vermelha dos frutos maduros de *Capsicum*. O DNA genômico foi extraído de 24 acessos pertencentes a quatro espécies: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*. Foram sintetizados os iniciadores de síntese específicos para a região codante e também do promotor do gene codificador da enzima Capsantina-capsorubina sintase (CCS) utilizando a informação genética disponível no GenBank. O par de iniciadores de PCR utilizados para a região codante ('PAL1D e PAL7R') foi capaz de amplificar um amplicom de 900 pb em todos os acessos. A sequencia nucleotídica correspondente a esta região foi bastante similar em todos os acessos estudados. Por outro lado, um amplicom único, mas com diferentes tamanhos, foi obtido com o par de iniciadores da região promotora do gene ('CCSpro1for' e 'CCSpro1rev') utilizando todos os acessos de fruto vermelho e também um acesso de fruto amarelo (*C. frutescens* 'CNPH 2871'). No entanto, nenhum amplicom foi observado utilizando como molde o DNA genômico de acessos de *C. annuum* 'CNPH 0180' e 'CNPH 0645' (ambos com frutos

amarelos). O tamanho do amplicom foi espécie-específico. Um amplicon de 920 bp foi observado exclusivamente em acessos de *C. annuum*. Um amplicon de 998 bp foi observado apenas em acessos de *C. baccatum* e *C. frutescens*. Um amplicon de 1117 bp foi observado na maioria dos acessos de *C. chinense* e um acesso tentativamente classificado como *C. frutescens*. Este trabalho revela a presença de diferenças estruturais na região do promotor do gene CCS nas diferentes espécies e acessos de *Capsicum*. Esta informação pode ser utilizada em sistemas de identificação de espécies/cultivares e na seleção assistida para determinação precoce de coloração de frutos maduros neste grupo de espécies de *Capsicum*.

ABSTRACT

Carotenoids are natural compounds that play crucial physiological roles in plants and important nutritional/nutraceutical functions in the diet of humans and animals. The mature fruits of *Capsicum* display an array of colors ranging from deep red, orange, yellow and brownish, which are mainly conditioned by the presence of distinct carotenoid pigments. The objective of the present work was to characterize the carotenoid profile of mature fruits of 20 accessions from four *Capsicum* species, via high performance liquid chromatography (HPLC). The lutein and violaxanthin were predominant pigments in accessions yellow-with fruits. The pigment α -carotene was predominant in accessions with orange fruit. The red-fruit accessions were rich sources of capsorubin/capsanthin. The only exception was the red-fruit cultivar 'Majjorca', which displayed a large amount of β -carotene when compared with capsorubin/capsanthin. One *C. chinense* accession with fruits with brown (chocolate) color was the only one with chlorophyll accumulation. The pigment diversity observed indicated it is feasible to improve (via classical breeding strategies) the amount of carotenoid pigments as well as its repertoire of nutritional/nutraceutical in *Capsicum* fruits. Genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthetic pathway have been analyzed as potential functional markers for the trait mature fruit color in *C. annuum*. The gene encoding the Capsanthin-capsorubin sintase is one of the major targets because the enzyme is responsible for the synthesis of the most important *Capsicum* carotenoids, which are related to the typical mature red fruit color. Genomic DNA was extracted from 24 accessions belonging to four species: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, and *C. baccatum*. Specific primers were synthesized targeting separately the coding region and the promotor region of the gene coding for Capsanthin-capsorubin synthase (CCS) using the genetic information available at the GenBank. A PCR primer pair ('PAL 1D' and 'PAL 7R') targeting the coding region was able to amplify an

amplicon of 900 bp in all accessions. The nucleotide sequence corresponding to the coding region was very similar in all the accessions studied. On the other hand, a single (but variable in size) amplicon was obtained with the primer pair targeting the promoter region of the CCS gene ('CCSpro1for' and 'CCSpro1rev') using genomic DNA of all red-fruit accessions and also in one yellow-fruit accession (*C. frutescens* 'CNPH 2871'). However, no amplicon was observed using DNA from *C. annuum* accessions 'CNPH 0181' and 'CNPH 0645' (both with yellow fruits) as genomic templates. The amplicon sizes were species-specific. The 920 bp amplicon was exclusively found in *C. annuum* accessions. The 998 bp amplicon was observed only in accessions of *C. baccatum* and *C. frutescens*. The 1117 bp amplicon was observed in the majority of the *C. chinense* accessions but also in one accession tentatively classified as *C. frutescens*. The present work indicates the presence of distinct structural features of the CCS promoter region across accessions and species of *Capsicum*. This information might be useful in species/cultivars fingerprinting systems and marker-assisted precocious selection programs for mature fruit color in this group of *Capsicum* species.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xiv
CAPÍTULO I	
Avaliação via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do perfil de carotenóides em acessos de quatro espécies de <i>Capsicum</i>	
1	1
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura	3
2.1. Botânica.....	3
<i>Capsicum annuum</i> L.....	4
<i>Capsicum baccatum</i> L.....	5
<i>Capsicum frutescens</i> L.....	5
<i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	6
<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz & Pavon.....	6
2.2. Importância Econômica.....	6
2.3. Estrutura dos Pigmentos Carotenóides.....	8
2.4. Funções dos carotenóides.....	8
2.5. A Cromatografia Líquida na Identificação de Carotenóides.....	10
3. Objetivo	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos Específicos	12
4. Materiais & Métodos	12
4.1. Acessos de espécies de <i>Capsicum</i>	12
4.2. Extração dos Carotenóides	13
4.3. Saponificação.....	14
4.4. Análise dos Carotenóides	14
4.5. Identificação dos Carotenóides.....	15
4.6. Determinação do Conteúdo dos Carotenóides:	16
5. Resultados & Discussão	17
6. Referências Bibliográficas	38

CAPÍTULO II

Variabilidade estrutural do gene codificador da Capsantina capsorubina sintase (CCS) em acessos de quatro espécies de <i>Capsicum</i> com diferentes cores de fruto.....	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. Introdução	46
2. Revisão de Literatura	47
2.1. Biologia Molecular da Via Biossintética dos Carotenóides	47
2.2. Genética clássica e molecular do acúmulo de carotenóides em frutos de <i>Capsicum</i>	48
2.3. Enzimas e Genes da Via Biossintética dos Carotenóides	50
2.4. A Via Biossintética dos Carotenóides em <i>Capsicum</i>	51
3. Objetivos	54
3.1. Objetivo geral	54
3.2. Objetivo Específico	54
4. Material & Métodos	54
4.1. Acessos de espécies de <i>Capsicum</i>	54
4.2. Extração de DNA.....	54
4.3. Amplificação da região codante e promotora do gene codificador da CCS.....	55
4.4. Sequenciamento da região codante e promotora do gene da Capsantina capsorubina sintase	56
5. Resultados & Discussão	56
6. Referências Bibliográficas	61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.

Obtenção da estrutura fina do espectro de carotenóides (modificada de BRITTON, 1995)..... 15

Figura 2.

Curva padrão de β -caroteno para quantificação dos carotenóides. 17

Figura 3.

Carotenóides totais em *Capsicum* em $\mu\text{g/g}$ de massa fresca. Colunas indicadas com a mesma letra não diferiram pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. 21

Figura 4.

Perfil de carotenóides em *Capsicum*, relacionando o acesso com o número de picos encontrados em cada acesso. Colunas indicadas com a mesma letra não diferiram pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade 21

Anexo I:

Perfil de carotenóides nos acessos de <i>Capsicum</i> analisados.	25
<i>Capsicum annuum</i> CNPH 0645	25
<i>Capsicum annuum</i> CNPH 0181	26
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 3017	26
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 0992.....	26
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 0279.....	27
<i>Capsicum annuum</i> CNPH 0183	27
<i>Capsicum annuum</i> CNPH 0189	28
<i>Capsicum annuum</i> CNPH 0148	28
<i>Capsicum annuum</i> 'Majjorca'	29
<i>Capsicum chinense</i> CNPH 2850	29
<i>Capsicum chinense</i> CNPH 0434	30
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 1363.....	30
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 1364.....	31
<i>Capsicum baccatum</i> CNPH 1397.....	31
<i>Capsicum chinense</i> CNPH 0679	32
Pico 1: Neoxantina	32
Pico 2: Violaxantina	33
Pico 3: Capsantina	33
Pico 4: Luteína.....	34
Pico 5: Zeaxantina	34
Pico 6: α -Criptoxantina.....	35
Pico 7: β -Criptoxantina	35
Pico 8: α - Caroteno	36
Pico 9: β - Caroteno.....	36
Pico 10: Clorofila	37

CAPÍTULO II

Figura 1.

Esquema da via Biossintética dos carotenóides em *Capsicum*..... 53

Figura 2.

Amplicons obtidos após amplificação com os “primers” PAL 1D e PAL 1R, específicos para a região codante do gene CCS, visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 58

Figura 03.

Fragmento do alinhamento da região codante do gene da Capsanthin/capsorubin synthase pelo método Clustal (Megalign-Lasergene, Madison, WI). 59

Figura 4.

Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando os produtos da amplificação de DNA de *Capsicum*, utilizando os iniciadores de síntese CCSPromF e CCSPromR, específicos para a região do pomotor do gene da Capsantina-capsorubina sintase..... 60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Quadro 1:

Código do acesso, espécie botânica e característica de coloração de fruto do germoplasma de *Capsicum* utilizado no presente estudo. 13

Tabela 1:

Composição de carotenóides (%) em acessos de quatro espécies de *Capsicum* 22

Tabela 2:

Conteúdo de carotenóide ($\mu\text{g/g}$) em *Capsicum* sp..... 23

Tabela 3:

Conteúdo de carotenóide ($\mu\text{g/g}$) em *Capsicum* sp.com base na curva de calibração de β -caroteno. 24

CAPÍTULO I

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

RESUMO

Os carotenóides são compostos naturais que apresentam papéis fisiológicos cruciais nas plantas e importantes funções nutricionais/nutracêuticas na dieta de seres humanos e animais. Os frutos maduros de *Capsicum* mostram uma gama de cores incluindo tonalidades de vermelho, laranja, amarelo e marrom as quais são condicionadas principalmente pela presença de distintos pigmentos carotenóides. O objetivo principal do presente trabalho foi caracterizar o perfil de carotenóides de frutos maduros de 20 acessos (de quatro espécies de *Capsicum*) via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A luteína e a violaxantina foram os pigmentos predominantes em acessos com frutos amarelos. O pigmento α -caroteno foi predominante em acessos com frutos alaranjados. Os acessos com frutos vermelhos foram fontes ricas de capsantina/capsorubina. A única exceção foi a cultivar 'Majjorca' que apresentou grande quantidade de β -caroteno quando comparada à capsantina/capsorubina. Um acesso de *C. chinense* com coloração marrom (chocolate) foi o único que acumulou clorofila. A diversidade de pigmentos encontrada aqui indica que é possível aumentar (via melhoramento clássico) o conteúdo e o repertório de carotenóides com funções em frutos de *Capsicum*.

ABSTRACT

Carotenoids are natural compounds that play crucial physiological roles in plants and important nutritional/nutraceutical functions in the diet of humans and animals. The mature fruits of *Capsicum* display an array of colors including shades of red, orange, yellow and brown which are mainly conditioned by the presence of distinct carotenoid pigments. The main objective of the present work was to characterize the carotenoid profile of mature fruits of 20 accessions (from four *Capsicum* species) via high performance liquid chromatography (HPLC). The lutein and violaxanthin were predominant pigments in accessions yellow-with fruits. The pigment α -carotene was

predominant in accessions with orange fruit. The red-fruit accessions were rich sources of capsorubin/capsanthin. The only exception was the red-fruit cultivar ‘Majjorca’, which displayed a large amount of β -carotene when compared with capsorubin/capsanthin. One *C. chinense* accession with fruits with brown (chocolate) color was the only one with chlorophyll accumulation. The pigment diversity observed here indicated that is feasible to improve (via classical breeding strategies) the amount as well as the repertoire of nutritional/nutraceutical carotenoid pigments in *Capsicum* fruits.

1. Introdução

O gênero *Capsicum* L. apresenta expressiva importância econômica, englobando diferentes grupos varietais de pimentas e pimentões. Este gênero é formado por aproximadamente 25 espécies selvagens e cinco domesticadas (*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. e *C. pubescens* R & P.), sendo todas nativas das Américas (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008). O cultivo de pimenta e pimentões tem se destacado pela amplitude de utilizações na alimentação humana, sendo empregada como hortaliça para consumo *in natura* e para a produção de molhos e conservas. O fruto desidratado e moído (pó de páprica doce ou picante) é empregado como flavorizante ou corante devido à diversidade de colorações que podem ser obtidas, variando do amarelo pálido ao vermelho intenso (SUDRÉ *et. al.*, 2010).

A coloração do fruto maduro é condicionada, em grande parte, pela presença de compostos carotenóides. Estes compostos apresentam importantes funções fisiológicas no tecido vegetal atuando na chamada “função de antena”, absorvendo o excesso de energia luminosa e dissipando-a sob a forma de calor (BILGER *et. al.*, 1995). O efeito nutracêutico dos compostos carotenóides em animais e seres humanos se deve ao elevado poder antioxidante destes compostos, atuando na eliminação de radicais livres e protegendo as células de sua ação nociva. Alguns carotenóides apresentam também a ação de pró-vitamina A, que é convertida, durante a digestão, para o retinol (a forma ativa da vitamina A) (FRASER & BRAMLEY, 2004).

A Embrapa Hortaliças possui uma coleção de germoplasma com cerca de 2000 acessos de *Capsicum*, englobando cultivares de polinização aberta, híbridos, populações de materiais cultivados, linhagens e materiais silvestres. O objetivo do presente

trabalho foi caracterizar a diversidade de compostos carotenóides em frutos maduros de acessos de quatro espécies de *Capsicum* desta coleção via CLAE/HPLC. Este estudo disponibiliza informações quanto ao conteúdo e ao perfil de carotenóides nos frutos destes acessos, contribuindo para o levantamento das potencialidades nutracêuticas e oferecendo suporte aos programas de melhoramento genético deste gênero.

2. Revisão de Literatura

2.1. Botânica

A taxonomia do gênero *Capsicum* tem sido dificultada devido à ampla variabilidade existente entre e dentro de acessos das espécies domesticadas e selvagens. Na década de 1950, diversas espécies de *Capsicum* foram classificadas dentro de outros gêneros (BOSLAND & VOTAVA, 1999). Atualmente, o gênero *Capsicum* é composto por 25 espécies selvagens e cinco domesticadas. As principais características utilizadas na distinção das espécies são relativas à morfologia floral (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008). Nesse atributo considera-se o número de flores por nó, posição da flor e do pedicelo, coloração da corola e da antera, presença ou ausência de manchas no lobo das pétalas e margem do cálice, formato dos frutos e características morfológicas das sementes (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008).

O gênero *Capsicum* é classificado dentro do reino Plantae como pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnolipsida, subclasse Asteridae, ordem Solanales, família Solanaceae (USDA, 2010). As espécies cultivadas do gênero *Capsicum* são: *C. annuum* (pimentão, pimentas e pimentas ornamentais), *C. baccatum* (pimentas dos grupos varietais dedo-de-moça, cambuci e chapéu-de-frade), *C. chinense* (pimentas-de-cheiro ou pimenta-de-bode, murici, murupi e pimenta-de-bico), *C. frutescens* (pimentas malagueta e tabasco) e *C. pubescens*, de sementes de coloração escura (PICKERSGILL, 1997). No gênero *Capsicum* as espécies domesticadas são autógamas, podendo ocorrer fluxo gênico devido à presença de insetos polinizadores. A taxa de alogamia pode variar entre 2 a 90% dependendo da localização e espaçamento das plantas e outras condições ambientais (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008; PICKERSGILL, 1997). As espécies *C. frutescens* e *C. chinense* podem ser cruzadas, facilmente, entre si e com *C. annuum* se esta for utilizada como espécie doadora de pólen (GREENLEAF, 1986). No entanto,

existem barreiras de cruzamento entre as três espécies e *C. baccatum*, sendo necessário a utilização de técnicas de resgate de embrião (YOON *et. al.*, 2006). A altura e a forma da planta variam de acordo com a espécie. Quanto à arquitetura, as plantas predominantes no gênero *Capsicum* podem ser classificadas como arbustos perenes (BOSLAND, 1996). O sistema de ramificação da planta apresenta um típico padrão de dicotomia que ocorre quando a planta atinge de 15 a 20 cm de altura. As hastes podem apresentar antocianina ao longo de seu comprimento e/ou nos nós, bem como presença ou ausência de pêlos. As raízes são do tipo pivotante, alcançando profundidades de 70 – 120 cm. As folhas apresentam tamanho, formato e pilosidade variados e a coloração é tipicamente verde, no entanto podem existir folhas violetas e variegadas. O formato do limbo foliar pode variar de ovalado, lanceolado a deltóide (BOSLAND & VOTAVA, 1999).

***Capsicum annuum* L.**

Nesta espécie estão incluídos os pimentões e algumas pimentas. Existe uma grande variabilidade fenotípica nos genótipos resultante, provavelmente, do processo de domesticação e posterior seleção e melhoramento genético (incluindo cruzamentos interespecíficos). Acessos desta espécie são encontrados tanto na forma selvagem quanto cultivada. Em seu ambiente selvagem, a planta é semi-perene, de hábito de crescimento ereto. Quando cultivada, é conduzida de forma anual, apresentando-se como planta herbácea. Nas flores, o cálice é bastante pronunciado, devido ao prolongamento das nervuras, sendo que no fruto este verticilo se apresenta pouco dentado e sem constrição anelar com o pedicelo (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008). Na antese o pedicelo, pode ser ereto, horizontal, ou pendente. As flores são hermafroditas, apresentando geralmente uma flor por nó, com pedicelos eretos, pendentes ou inclinados, na fase de antese. A corola é branca, raramente violeta, sem mancha na base dos lobos. Geralmente, as anteras são azuladas (CASALI & COUTO, 1984). Os frutos de formato cônico ou cúbico são do tipo bagas ocas, de cores vermelha, amarela, dentre outras, quando maduros, apresentando polpa firme, embora algumas populações silvestres apresentem polpa mole e frutos pequenos. As sementes são cor de amarelo-palha (CASALI & COUTO, 1984).

***Capsicum baccatum* L.**

Os tipos mais comuns e cultivados da espécie *C. baccatum* no Brasil são as pimentas Chifre-de-Veados, Cambuci (conhecida como Chapéu de Frade) e Dedo-de-Moça. Neste grupo, a pungência dos frutos é menos acentuada; há inclusive cultivares não pungentes, tais como a pimenta Cambuci. Esta espécie apresenta duas variedades botânicas: *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum*. As plantas, quando mantidas por alguns anos, chegam a formar verdadeiros arbustos, chegando a 3,0 m de altura, folhas membranáceas longipeciouladas e caule apresentando dicotomia evidente com pedicelo ereto durante a antese (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008). As flores são em número de uma a duas por nó. A corola é branca e sempre com manchas típicas de coloração escura na base das pétalas, o cálice, quando o fruto está maduro, possui apêndices pronunciados e sem constrição anelar. Os frutos desta pimenta são pequenos, de coloração vermelha quando maduros, e dependendo da variedade podem ser alongados, arredondados ou ovalados (BIANCHETTI, 1996; CARVALHO *et. al.*, 2009). As sementes são claras, amarelas, beges ou brancas (CASALI & COUTO, 1984).

***Capsicum frutescens* L.**

Estas pimentas são extremamente picantes (com alta concentração de capsaicinóides), e são representadas pelo grupo varietal “Malagueta”, amplamente disseminado no Brasil (CASALI & COUTO, 1984) e o grupo varietal “Tabasco”, bastante consumido no mundo todo. Esta espécie apresenta plantas arbustivas, vigorosas, com altura de 0,9 a 1,2 m e bastante ramificadas, folhas glabras de formato oval a alongadas, medindo de 7-13 x 5-7 cm e pedicelo ereto, durante a antese. Suas flores estão agrupadas de uma a três por nó, apresentando corola de cor branca esverdeada e sem manchas, anteras geralmente azuis, ou violetas. Os frutos são pequenos de formato alongado e quando maduros, são de coloração vermelha, bem picante, com 2,5 a 5,0 cm de comprimento e 0,3 a 0,5 cm de diâmetro (CARVALHO *et. al.*, 2006).

***Capsicum chinense* Jacq.**

O nome da espécie, *Capsicum chinense*, conferido por Nicolaus Joseph Von Jacquin surgiu de um equívoco, quando este pesquisador supunha que este genótipo fosse originário da China (BOSLAND & VOTAVA, 1999). Esta espécie pode ser facilmente confundida com *C. frutescens*, devido ao estreito relacionamento genético entre ambas. A planta apresenta folhas glabras de formato ovado a ovado lanceoladas, os ramos também são desprovidos de pelos. As flores estão dispostas de três a cinco por nó, raramente, solitárias, apresentam corola, predominantemente, branca-esverdeada, sem manchas amareladas na base dos lobos. Geralmente, as anteras são azuis, roxas, violetas ou amarelas, o cálice tem cinco apêndices ou às vezes desprovido destes, o pedicelo é pendente, raramente, ereto, os frutos com 1,0 a 12 cm de comprimento apresentando formas e cores variadas (LUZ, 2007). A principal distinção morfológica desta espécie é uma constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008).

***Capsicum pubescens* Ruiz & Pavon**

A espécie *Capsicum pubescens* foi descrita pela primeira vez por RUIZ & PAVON (1794). Dentre as espécies domesticadas de *Capsicum* é a única que não ocorre naturalmente no Brasil, sendo nativa da região Andina. São plantas que podem chegar de 2,4 m a 4,5 m de altura. As folhas são ovaladas, pilosas, medindo 8,0 x 5,0 cm. Morfológicamente, difere das demais espécies domesticadas, apresentando flores solitárias de tamanho grande, brancas ou roxas, com pedicelo ereto durante a antese. Os frutos podem ser alongados a esféricos. Esta espécie caracteriza-se por apresentar sementes escuras a pretas, sendo a única que se adapta as condições andinas (BASU & KRISHNA, 2003).

2.2. Importância Econômica

As pimentas e pimentões são cultivados, praticamente, em todo o mundo, destacando-se os países, como China, Tailândia, Coreia do Sul, Índia, Japão, México, Estados Unidos e o Brasil (RUFINO & PENTEADO, 2006). No Brasil a produção de

pimentão é cerca de 250.000 t e as de pimentas está em torno de 19.000 t (IBGE, 2010). O cultivo das pimentas e pimentão é uma alternativa para o setor agrícola, encontrando condições favoráveis de desenvolvimentos em todas as regiões produtoras do Brasil. De acordo com dados do IBGE (2006), o estado de São Paulo ocupa o primeiro lugar com uma estimativa de produção de pimentas e pimentões de 53.200 t, seguido do estado de Minas Gerais com 39.500 t. No que se refere apenas à produção de pimentas, o estado de São Paulo permanece em primeiro lugar, com 4.700 t, seguido pelo do estado do Ceará, com 3.500 t. O Distrito Federal produz em torno de 7000 toneladas, incluindo pimentas e pimentões, com valor de mercado de, aproximadamente, cinco milhões de reais anuais (IBGE, 2010).

O agronegócio de pimenta e pimentão apresenta grande capacidade de geração de emprego e renda, tendo uma grande importância na agricultura familiar, devido à grande demanda de mão de obra, chegando a contribuir com 60,8% do custo de produção. A cultura apresenta também elevada taxa de retorno do investimento, com uma renda bruta que oscila entre R\$ 4 e 25 mil/ha/ano (VILELA *et. al.*, 2008; GONÇALVES, 2004). O cultivo de pimentas e pimentões tem se destacado pelo grande aproveitamento na alimentação humana como hortaliça de acompanhamento ou na forma de pó, como flavorizante ou corante. Em adição, essa plantas apresentam frutos com grande diversidade de cores, variando do amarelo pálido ao vermelho intenso. O processamento das pimentas em pequenas e médias agroindústrias, diretamente pelo produtor, confere maior rentabilidade. A associação pequeno agricultor / agroindústria traz maior segurança e certeza de mercado, devido à ampliação em diversas linhas de produtos tanto para consumo interno quanto para exportação. Desta forma, o plantio de pimenta e pimentão desenvolve-se preferencialmente nas localidades próximas às agroindústrias.

Outro conjunto de características de interesse, que estimulam o consumo e produção das espécies o gênero *Capsicum*, é a ampla utilização na culinária, devido as suas propriedades de acentuar sabor, aroma e cor a diversos pratos. Considerando o consumo dos frutos verdes e *in natura*, o pimentão é a principal fonte de vitamina C dentre as hortaliças, contendo até 180 mg/100g, ultrapassando o teor das frutas cítricas, fontes tradicionais desta vitamina (LÚCIO *et. al.*, 2003). Também, existem algumas variedades de *C. annum* que produzem metabólitos secundários na placenta dos frutos, os quais são denominados capsaicinóides e condicionam a característica de pungência

(“ardência”) nestes frutos (HARVELL & BOSLAND, 1997). Estas variedades são utilizadas na fabricação de molhos, muito apreciados em diferentes regiões do Brasil.

2.3. Estrutura dos Pigmentos Carotenóides

A estrutura química dos carotenóides é formada por um esqueleto tetra terpeno, ciclizado em uma ou em duas extremidades. Existem cerca de 600 estruturas carotenóides caracterizadas. Esta diversidade é devido a processos de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou via combinação destes processos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A cadeia poliênica de 40 átomos de carbono pode ter de três a quinze duplas ligações conjugadas, que constituem o cromóforo da molécula. O comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor do pigmento. A cor é menos intensa quanto menor é o número de duplas ligações conjugadas. Um número menor de duplas ligações conjugadas afeta também o comprimento de onda máximo do espectro. Um exemplo é a molécula de fitoeno que apresenta apenas três duplas ligações conjugadas e se apresenta como um composto desprovido cor e apresentando um espectro com comprimento de onda máximo de 286 nm. O processo de ciclização do esqueleto de 40 carbonos dos carotenóides em uma ou ambas as extremidades da molécula, pode dar origem a sete diferentes grupos terminais. Somente quatro grupos (β , ϵ , κ e ψ) são encontrados nos carotenóides de vegetais superiores (FRASER & BRAMLEY, 2004). Outras modificações estruturais encontradas no esqueleto carbônico destes pigmentos são a alteração no nível de hidrogenação da molécula e a adição de grupos funcionais contendo oxigênio. Carotenóides formados somente por átomos de carbono e hidrogênio são chamados de carotenos. Por sua vez, os carotenóides oxidados (xantofilas) apresentam grupos substituintes como oxigênio, hidroxilas e os grupos ceto e epóxi (BRITTON, 1995).

2.4. Funções dos carotenóides

O processo de redução da molécula de oxigênio pela água, durante a fotossíntese, provoca a formação de ânions (radicais super óxidos, peróxidos de

hidrogênio e hidroxilas) devido à transferência de um, dois ou três elétrons, respectivamente, apresentando-se como radicais altamente reativos (radicais livres). A formação de radicais livres, também pode ocorrer pela presença de radiação como, por exemplo, raios-X, ultra-som, microondas e ultravioleta. Estas fontes de radiação podem excitar a molécula de oxigênio de um estágio tripleto (estável) para a forma singleto (altamente energética). O oxigênio singleto pode reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídeos causando danos celulares. Para evitar e/ou minimizar este processo, os organismos vivos dispõem dos carotenóides e outras estratégias de defesa que combatem os danos causados pelo oxigênio singleto (SIES, 1996).

Neste contexto, os pigmentos carotenóides são componentes essenciais em todos os organismos fotossintéticos. Estes compostos são sintetizados e armazenados nos cromoplastos e estão envolvidos na coleta de energia luminosa e na proteção do sistema fotossintético contra os efeitos danosos do oxigênio produzido pela super excitação da clorofila, devido ao excesso de energia luminosa, eliminando o oxigênio singleto produzido no centro de reação do fotossistema II, durante a fotossíntese (STAHL & SIES, 1999). Os cromoplastos são plastídios encontrados em diversas flores e frutos que acumulam carotenóides conferindo as típicas colorações amarelas, laranjas ou vermelhas (GIULIANO & DIRETTO, 2008). Nos vegetais superiores, os carotenóides presentes nas flores e frutos, também estão envolvidos na atração de animais que participam dos processos de polinização e dispersão de sementes (GIULIANO *et. al.*, 2003). Além disso, os carotenóides agem como precursores na biossíntese do ácido abscísico (ABA), um hormônio vegetal envolvido na dormência, maturação e diferenciação de células embriogênicas e na tolerância a estresses abióticos (LEMOS, 2000) na atividade de pró-vitamina A (AMBRÓSIO *et. al.*, 2006) e na ação antioxidante (COSTA, *et. al.*, 2008).

Na dieta de seres humanos e animais, os carotenóides são fontes de pró-vitamina A. No entanto, das 600 estruturas de carotenóides conhecidas, poucas apresentam atividade de pró-vitamina A. A classe de carotenóides com essa função apresenta no mínimo uma cadeia poliênica de 11 carbonos e como grupo terminal um anel β (RODRIGUEZ AMAYA, 2001). Dentre os carotenóides pró-vitamina A, o β -caroteno atua com maior eficiência como precursor do retinol (vitamina A). Teoricamente, uma molécula de β -caroteno gera duas moléculas de retinol, através de uma clivagem enzimática no centro da molécula. A conversão de β -caroteno em retinol ocorre na

parede do intestino delgado (AMBRÓSIO *et. al.*, 2006). Esta clivagem pode, também, ocorrer de forma assimétrica, originando os chamados β -apocarotenos. Nos vegetais esses compostos estão envolvidos na produção de compostos voláteis aromáticos, sendo fatores importantes na atração de insetos polinizadores e na formação de compostos de defesa contra doenças, pragas e condições ambientais adversas.

A conversão de β -caroteno em vitamina A, está relacionada com o tipo de carotenóide, quantidade de carotenóide consumido na dieta, matriz na qual os carotenóides estão presentes, estado nutricional do indivíduo e a fatores de absorção e genéticos (AMBRÓSIO *et. al.*, 2006). A eficiência de conversão de β -caroteno em retinol e sua taxa de absorção foram estabelecidas, sendo que 12 μg de β -caroteno *trans* ou 24 μg de carotenóides do tipo pró-vitamina A *trans* se equivalem a 1 μg de retinol *trans* (CAMPOS & ROSADO, 2005).

Outra importante função dos carotenóides, na dieta de seres humanos e animais, é o seu poder antioxidante, sequestrando substâncias que reagem ao oxigênio, tais como o radical peróxido e o oxigênio singlete, reduzindo, desta forma, o risco de ocorrência de certos tipos de câncer (SIES, 1996). Um antioxidante é uma molécula capaz de reduzir ou prevenir reações químicas que envolvam transferência de elétrons, impedindo, desta forma, a formação de radicais livres. A proteção antioxidante dos carotenóides é fornecida pelo grupo de pigmentos que apresenta nove ou mais dupla ligações conjugadas na cadeia poliênica. Por esta razão o licopeno se comporta como o mais eficiente antioxidante dentre os pigmentos carotenóides conhecidos (COSTA *et. al.*, 2008). Não existem relatos da acumulação de licopeno em frutos maduros do gênero *Capsicum*. No entanto, estudos demonstraram que a capsantina (pigmento carotenóide típico de frutos vermelhos de *Capsicum*) apresenta uma capacidade de inativação de radicais livres muito próxima quando comparada com a de outros carotenóides com similar função (MATSUFUJI *et. al.*, 1998).

2.5. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) na Identificação de Carotenóides.

O método de HPLC foi introduzido na área de pesquisa de carotenóides na década de 1970. Desde então, vários trabalhos utilizando HPLC foram publicados, incluindo diferentes métodos de aplicações. Esta técnica permite uma separação rápida e

precisa de substâncias, e sua detecção em quantidades muito reduzidas ('traços') nas amostras (GROSS, 1991). Na identificação dos carotenóides, por cromatografia, utiliza-se a propriedade de absorção de luz desses pigmentos, sendo esta característica a que fornece uma melhor indicação do cromóforo (BRITTON, 1995). O comprimento de absorção de luz aumenta com o número de duplas ligações conjugadas, no entanto a absorção pode ser alterada em função das características estruturais dos carotenóides e pelo solvente usado (MOSS & WEEDON, 1976). O espectro de absorção UV-visível é o primeiro passo na identificação de carotenóides, observando os comprimentos máximos de ondas e a forma do espectro (estrutura fina) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A maioria dos carotenóides apresenta absorvência em 3 comprimentos de onda, resultando em um espectro com três picos. Esse espectro é característico destes compostos, sendo possível a partir desses valores determinar a estrutura fina da molécula (BRITTON, 1995). A estrutura fina é determinada pela razão percentual entre valores de absorção do pico de maior comprimento de onda (III) e o pico de absorção do médio (II), tomando-se como referência o mínimo entre os dois picos (Figura 1).

A maioria dos carotenóides absorvem luz entre os comprimentos de onda de 400 a 500nm. A diferença entre os espectros de absorção dos diversos carotenóides, tanto pela posição do comprimento de onda máximo, quanto pela estrutura fina (% III/II), são importantes para identificação desses compostos por cromatografia. No entanto, apenas o espectro de absorção não é suficiente para caracterizar um carotenóide, sendo necessário informações adicionais sobre a polaridade e a presença de grupos funcionais. Deste modo, existe um critério mínimo para identificação dos carotenóides (BRITTON, 1995).

Com relação a utilização de padrões para quantificação de carotenóides, constata-se que nem sempre estes estão disponíveis comercialmente e em algumas situações não podem ser preparados. Assim sendo SCHIEDT & LIAAEN-JENSEN (1995) sugeriram alguns critérios para identificação de carotenóides: (1) O espectro de absorvência na região do UV-Vis, deve ser obtido em no mínimo dois solventes diferentes e devem estar de acordo com o cromóforo sugerido; (2) as propriedades cromatográficas do pigmento e do padrão devem ser idênticas e ambos os compostos devem co-eluir e (3) o espectro de massa deve ser obtido para confirmação da massa molecular.

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

- O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade de pigmentos do grupo dos carotenóides quanto à composição e teores de em acessos de quatro espécies do gênero *Capsicum*.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar acessos do banco de germoplasma, incluindo linhagens, cultivares e espécies selvagens do gênero *Capsicum*, quanto à composição de carotenóides.
- Identificar acessos que sejam potenciais fontes de nutrientes e elementos nutracêuticos para utilização no melhoramento genético de cultivares de *Capsicum*.

4. Materiais & Métodos

4.1. Acessos de espécies de *Capsicum*.

Diferentes espécies e variedades de *Capsicum* foram selecionadas do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças, com base nas diferentes cores do fruto quando maduro, variando do branco ao vermelho (Quadro 1). As pimentas e pimentões foram cultivados em casa de vegetação, em dezembro de 2008, sob controle de umidade (entre 90% e 95%) e com temperatura diurna variando entre 21 °C e 30 °C e temperatura noturna oscilando entre 15°C e 19°C. As plantas foram mantidas em vasos de 5L, preenchidos com solo esterilizado, em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças, em Brasília–DF.

Quadro 1 – Código do acesso, espécie botânica e característica de coloração de fruto do germoplasma de *Capsicum* utilizado no presente estudo.

Código dos acessos	Espécie de <i>Capsicum</i>	Cor do fruto maduro
CNPH 0189	<i>C. annuum</i>	Vermelho
Majjorca	<i>C. annuum</i>	Vermelho
CNPH 0148	<i>C. annuum</i>	Vermelho
CNPH 0181	<i>C. annuum</i>	Amarelo
CNPH 0183	<i>C. annuum</i>	Vermelho
CNPH 0645	<i>C. annuum</i>	Amarelo
PPX 37	<i>C. annuum</i>	Laranja
CNPH 2852	<i>C. chinense</i>	Branco
CNPH 0578	<i>C. chinense</i>	Branco
CNPH 0679	<i>C. chinense</i>	Marrom
CNPH 2850	<i>C. chinense</i>	Vermelho
CNPH 0434	<i>C. chinense</i>	Vermelho
CNPH 1397	<i>C. baccatum</i>	Vermelho escuro
CNPH 1363	<i>C. baccatum</i>	Vermelho
CNPH 1364	<i>C. baccatum</i>	Vermelho
CNPH 0992	<i>C. baccatum</i>	Laranja
CNPH 3017	<i>C. baccatum</i>	Laranja
CNPH 0279	<i>C. baccatum</i>	Laranja
Tabasco	<i>C. frutescens</i>	Vermelho
CNPH 2871	<i>C. frutescens</i>	Amarelo

4.2. Extração dos Carotenóides

Os frutos foram colhidos em junho de 2009, sendo utilizados, no mínimo, três frutos de cada acesso/espécie. Foram obtidas 10 g de tecido homogeneizado do pericarpo do fruto. As sementes foram removidas e as amostras da polpa dos frutos foram armazenadas em freezer a -20°C , até o momento da extração. O método de extração foi conduzido de acordo com o procedimento descrito por RODRIGUEZ-AMAYA (2001). Para a extração dos carotenóides do tecido homogeneizado foi adicionado 40 mL de acetona (repetidas vezes) até a completa extração dos carotenóides das amostras, determinada pela ausência de cor no tecido. Nesta etapa as amostras foram submetidos a um extrator (Polytron, Kinematica), seguida de uma filtragem a vácuo, com o auxílio de um kitasato em ambiente com baixa luminosidade, visando

minimizar a foto-oxidação dos pigmentos. A partição dos carotenóides foi feita com o uso de 40 mL de éter de petróleo adicionados ao extrato, em um funil de decantação. Os pigmentos foram transferidos da acetona para o éter de petróleo através de pequenas frações, seguidas de água destilada, descartando-se a fase inferior, até a total remoção da acetona. A solução dos pigmentos em éter de petróleo foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, passando por um filtro contendo sulfato de sódio, como material higroscópico, para retirada do excesso de água do material. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância através de um espectrofotômetro UV – visível, a 451 nm. Posteriormente, o éter foi evaporado em um evaporador rotatório. Para análise, via HPLC/CLAE, os carotenóides foram re-dissolvidos em 2 mL de acetona seguida de uma filtração em filtro hidrofóbico (Millex – FH – Millipore, polytetrafluoretileno-PTFE, 0,45 mm), com auxílio de uma seringa de vidro. Uma amostra de 10 µL obtida a partir desta solução foi, imediatamente, injetada no cromatógrafo.

4.3. Saponificação

O método de saponificação consistiu na incubação, no escuro, do extrato em éter de petróleo após adição de 10% (m/v) de KOH em metanol, por 16 horas (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

4.4. Análise dos Carotenóides

As análises dos carotenóides foram feitas em triplicatas. Para determinação dos teores e tipos dos carotenóides foi seguido o procedimento descrito por RODRIGUEZ-AMAYA (2001), via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A plataforma CLAE utilizada consistiu de um computador com sistema de dados (LC Solucion-Shimadzu), um auto-injetor de amostra e um detector visível/ultravioleta com arranjo de fotodiodo (Shimadzu). Na análise por CLAE, a separação foi feita de forma isocrática em uma coluna monomérica C18 (Waters ODS2) de fase reversa 3,0 µm, 4,6 x 150 mm. A fase móvel foi composta por acetonitrila:metanol:acetato de etila na proporção 8:1:1 (v:v:v). O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/minuto e o tempo total de corrida de 60 minutos.

4.5. Identificação dos Carotenóides

O perfil dos carotenóides foi obtido a partir de um foto detector do tipo fotodiodo (PDA – “photodiode array detector”) UV-vis (ultravioleta – visível) que gerou um espectro de absorção de cada carotenóide na amplitude de comprimento de onda de 190 a 800nm. A identificação dos carotenóides foi baseada no uso combinado do tempo de retenção (t_R) e o espectro de absorção ultravioleta e visível, obtido pelo foto detector fotodiodo, comparado com o cromóforo (dados publicados na literatura) e pela observação da estrutura fina dos carotenóides, que é a relação percentual entre a absorbância do pico de maior comprimento de onda e o pico central dos carotenóides (% III/II), conforme esquema apresentado na Figura 1.

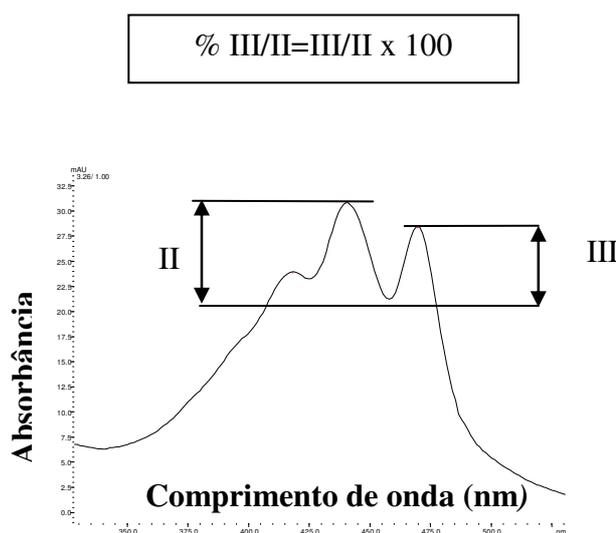


Figura 1. Obtenção da estrutura fina do espectro de carotenóides (modificada de BRITTON, 1995)

4.6. Determinação do Conteúdo dos Carotenóides:

A quantidade de carotenóides totais foi obtida mediante a leitura de absorbância em espectrofotômetro utilizando a fórmula descrita por BIANCHINNI & PENTEADO (2006) e o cálculo do teor de carotenóides totais foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\mu\text{g/g} = \frac{\text{absorbância máxima} \times \text{volume de solução} \times 10^6}{10^2 \times A_{1\text{cm}} \times \text{massa da amostra (g)}}$$

A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tuckey. O conteúdo de cada um dos carotenóides identificados nas amostras dos frutos de *Capsicum* foi obtido utilizando o programa de quantificação LC solution[®] 6.1 (Shimadzu). Neste programa as áreas dos picos obtidas nos cromatogramas foram integradas, automaticamente, fornecendo o percentual de cada carotenóide presente na amostra. Foi calculado o valor percentual de cada carotenóide identificado sobre o teor de carotenóides totais obtidos por espectrofotometria a 451 nm, obtendo-se a quantidade em $\mu\text{g/g}$ de cada carotenóide identificado. Foram utilizados padrões de α -caroteno e β -caroteno, extraídos de raízes de cenoura de coloração laranja e quantificados por espectrofotometria a 451 nm, utilizando-se a fórmula descrita por BIANCHINNI & PENTEADO (2006). Estes padrões serviram de base para verificação do tempo de retenção destes pigmentos na amostra e também para a construção da curva padrão de carotenóides (Figura 2) que foi plotada pelas concentrações crescentes de β -caroteno *versus* a área dos picos correspondentes, obtidas através do sistema CLAE, utilizando-se o mesmo procedimento descrito na análise de carotenóide (item 4.4), com exceção do tempo de corrida que foi de 30 minutos.

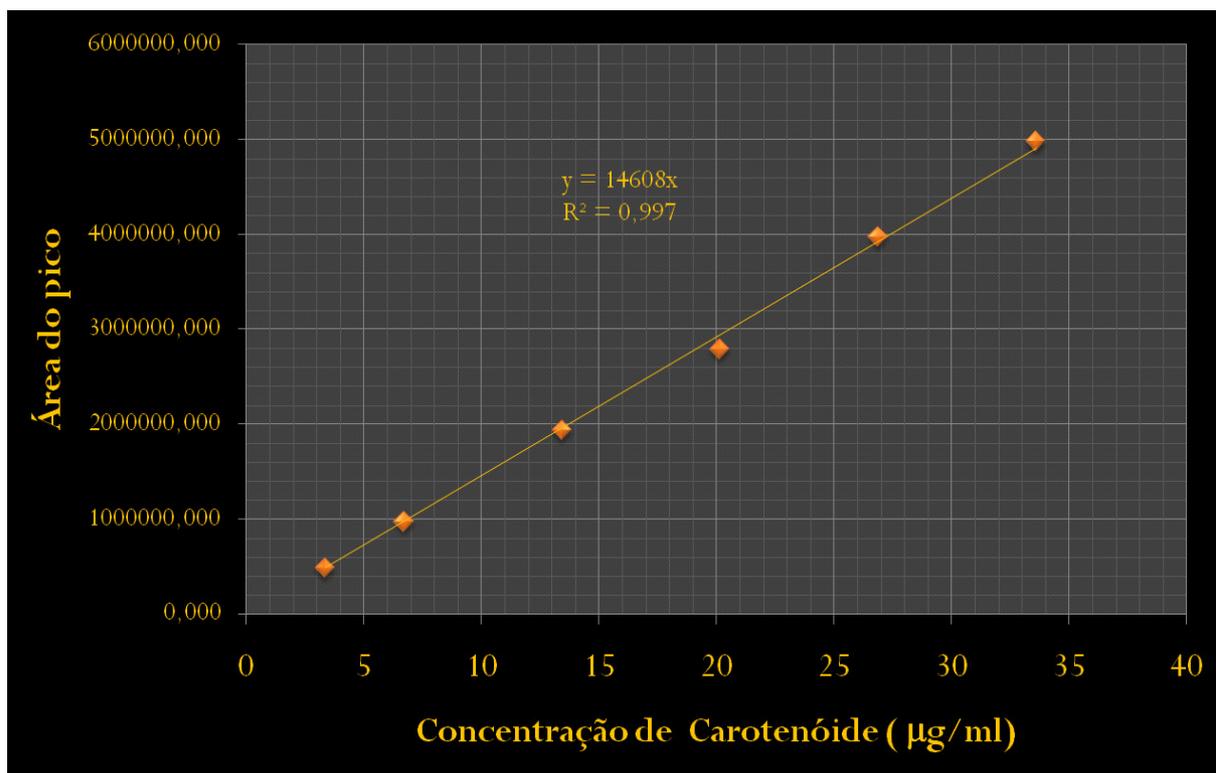


Figura 2. Curva padrão de β -caroteno para quantificação dos carotenóides.

5. Resultados & Discussão

A coloração apresentada nos frutos de *Capsicum* é determinada, em grande parte, pela quantidade e pela composição de carotenóides depositados nos cromoplastos (HA *et. al.*, 2007). Os frutos maduros das diferentes variedades de *Capsicum*, analisados neste trabalho, apresentaram grande diversidade de cores incluindo frutos brancos, amarelos, laranjas, vermelhos e marrons. A análise de variância e o teste de Tuckey mostraram que existem diferenças significativas entre os acessos avaliados em relação ao conteúdo de carotenóides totais (Figura 3). Estudos prévios indicaram que frutos vermelhos tendem a acumular uma maior quantidade de carotenóides totais comparados com frutos não-vermelhos. Também, os frutos amarelos acumulam maior quantidade de carotenóides que frutos de cor alaranjada (HA *et. al.* 2007). No presente estudo, os resultados obtidos confirmaram que os frutos vermelhos são fontes mais ricas de carotenóides totais. No entanto, os frutos de cor alaranjada apresentaram conteúdos de carotenóides totais mais elevados ou similares aos frutos de cor vermelha. Estes dados

indicaram que a regulação do acúmulo de carotenóides em *Capsicum* é espécie específica. Ressalta-se que o único acesso com frutos de cor alaranjada avaliado por HA *et. al.* (2007), pertence a espécie *C. chinense*, enquanto os acessos avaliados. no presente estudo, foram de *C. baccatum* e *C. annuum*. No acesso CNPH 0679 (*C. chinense*) (fruto de coloração marrom) o teor de carotenóides totais foi de 1995,37 µg/g, sendo este valor o triplo da quantidade observada nos demais acessos (Figura 3). O acesso CNPH 02852 (fruto de cor branca) apresentou a menor quantidade de carotenóides totais (67,38 µg/g), seguido pelos acessos: CNPH 578 (branco), PPX 37(laranja), CNPH 2871 (amarelo), CNPH 0181(amarelo), CNPH 0645 (amarelo), CNPH 1363 (vermelho), e tabasco (vermelho), não diferindo entre si pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto à composição de carotenóides, verificou-se que todos os acessos apresentaram uma grande diversidade de pigmentos (entre 10 e 34 diferentes picos, Figura 4). No entanto, a maioria destes pigmentos ocorre em baixas concentrações. Uma similar complexidade no perfil foi encontrada por AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA (2009) utilizando tanto CLAE quanto testes químicos e espectrometria de massa. Nos frutos vermelhos e marrons os pigmentos encontrados com a maior concentração são capsantina e capsorubina seguidos de β-caroteno. Por exemplo, no acesso 'CNPH 0183, as porcentagens dos diversos pigmentos foram: Capsantina/Capsorubina (43%) e β-caroteno (22%), que correspondem a mais de 60% da concentração de carotenóide totais presentes na amostra.

Nos acessos com frutos de cor laranja os principais carotenóides foram β-caroteno e α-caroteno, ambos com atividade de pró-vitamina A (BRITON, 1995). O pigmento α-caroteno e β-caroteno equivalem, respectivamente, a uma e duas moléculas de retinol. Em geral, os acessos com frutos de cor laranja representaram as melhores fontes de pró-vitamina A (Tabelas 1 e 2 , linha α-caroteno + β-caroteno) com valores entre 138,38 a 275, 34. Estes valores são maiores que quase todos os acessos de cor vermelha, com exceção dos acessos Majorca e CNPH 0679, com frutos marrons, que alcançou valores de 432,35 µg/g de carotenóides pró-vitamina A. Estes dados confirmam a presença de uma ampla variação para teores de carotenóides em espécies e acessos do gênero *Capsicum*.

O interesse médico no uso de luteína e de zeaxantina na saúde humana é bastante expressivo, pois esses pigmentos são componentes essenciais na proteção

macular do olho (BOTELLA-PAÍVA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006). A luteína é o principal pigmento carotenóide em tecidos clorofilados (HA *et. al.*, 2007; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001) e tem papel importante na fotossíntese (SANDMANN *et. al.*, 2006). Este pigmento foi predominante em frutos de coloração amarela, seguido pela violaxantina e neoxantina. No acesso CNPH 0645 (Figura 3), de coloração amarela, o teor de luteína foi de 45,91 µg/g. Outro acesso de coloração amarela, o CNPH 0181 (Figura 3), apresentou teor de luteína de 13,98 µg/g. A luteína foi também o principal carotenóide encontrado no pimentão amarelo analisado por HEINONEN *et. al.* 1989, estando presente com um teor de 7,70 µg/g, enquanto que no trabalho de MATUS *et. al.*, 1991, a violaxantina foi o carotenóide mais abundante representando 34,07% dos carotenóides totais de acessos de *Capsicum* amarelos. A luteína não foi detectada em frutos vermelhos e alaranjados de *C. baccatum*, sendo detectado nas demais espécies. Os únicos frutos brancos analisados (CNPH 2852 e CNPH 578) (Figura 4) apresentaram apenas traços de luteína, indicando que toda a via biossintética foi funcional até este pigmento. No entanto foram sintetizadas quantidades mínimas de cada precursor que foram convertidos para luteína.

Durante o amadurecimento dos frutos de *Capsicum* os cloroplastos são convertidos em cromoplastos e os níveis dos pigmentos capsantina e capsorubina aumentam. Também, ocorre a esterificação desses pigmentos com ácidos graxos (BIACS *et. al.*, 1989, SANDMANN *et. al.*, 2006). Os pigmentos esterificados podem ser saponificados durante a extração, retornando à sua forma não-esterificada, resultando em um cromatograma de interpretação mais simplificada. Neste trabalho foi realizada a extração com e sem saponificação. Nas condições experimentais utilizadas, o processo de saponificação não foi satisfatório. Os picos correspondentes aos carotenóides esterificados não foram eliminados do cromatograma. Desta forma, os pigmentos capsantina e capsorubina formaram um único e indistinguível pico e foram, por esta razão, quantificados em conjunto (Tabela 1). Estes dois pigmentos ocorreram apenas em frutos vermelhos em proporções que variaram de 20 a 55% do total dos carotenóides. Nos cromatogramas apresentados no anexo I, os ésteres de carotenóides eluídos antes do β-caroteno são monoésteres de carotenóides, enquanto que os eluídos depois do β-caroteno representam diésteres de carotenóides (FISHER e KOCIS, 1987). Este mesmo padrão de esterificação foi encontrado por BIACS *et. al.*, 1989, estudando os pigmentos carotenóides em *C. annum*. Os diésteres de capsantina e capsorubina

isolados de *C. annuum* mostraram ser potentes inibidores de tumores in vitro, e capsantina, capsantina esterificada (3'-éster e 3,3' éster) exibiram potente atividade inibidora de tumores in vivo (MAOKA *et. al.*, 2001), o que justifica a busca de acessos que acumulam estes dois pigmentos em frutos.

O acesso marrom analisado acumulou níveis elevados de α - e β -caroteno (432 $\mu\text{g/g}$) e, também, de capsantina e capsorubina (457 $\mu\text{g/g}$), luteína (21 $\mu\text{g/g}$) e zeaxantina (59 $\mu\text{g/g}$). A cor marrom do fruto de pimentão está associada ao gene “*chlorophyll retainer (cl)*” (BOROVSKY & PARAN, 2008) que controla a ausência da degradação da clorofila, durante o amadurecimento do fruto. É interessante observar que estudos anteriores relataram um maior acúmulo de carotenóides totais no acesso *C. annuum* ‘Negral’ que, também, contém o gene *cl* (HORNERO-MÉNDEZ *et. al.*, 2000). Os resultados com o acesso CNPH 0679 confirmam este padrão e coloca este mutante como promissora fonte para o melhoramento genético de *Capsicum*, visando aumentar o conteúdo de uma fração representativa dos carotenóides nutracêuticos conhecidos.

Em relação a análise dos resultados obtidos pela curva de calibração, observou-se uma diferença dos dados quantificados com base no percentual de cada pico carotenóide em relação aos carotenóides totais. Os dados obtidos com base na curva de calibração de β -caroteno (Tabela 3) foram mais similares aos publicados na literatura (RODRIGUES-AMAYA, *et. al.*, 2008). Devido, a diversidade de carotenóides existente, é possível que seja necessário ajustar um valor do coeficiente de absorção para que seja utilizada na determinação de carotenóides totais em *Capsicum*. Os acessos CNPH 2852, CNPH 578, CNPH 2871, PPX 37 e Tabasco foram quantificados apenas pela curva de calibração de β -caroteno.

Pela análise dos resultados obtidos observou-se que o germoplasma das espécies selvagens de *Capsicum* apresenta um enorme potencial para contribuir no melhoramento genético de pimentas e pimentões cultivados, visando o desenvolvimento de variedades que combinem os principais carotenóides nutracêuticos. Estes acessos podem, também, ser utilizados em estudos básicos de genética e genômica, visando identificar os componentes associados com maiores níveis e diversidade de carotenóides de relevância nutricional. Estes estudos poderão gerar ferramentas para a obtenção de marcadores moleculares úteis no monitoramento de genes responsáveis por acúmulo diferenciado de carotenóides em teores elevados nas cultivares desenvolvidas via melhoramento genético de *Capsicum*.

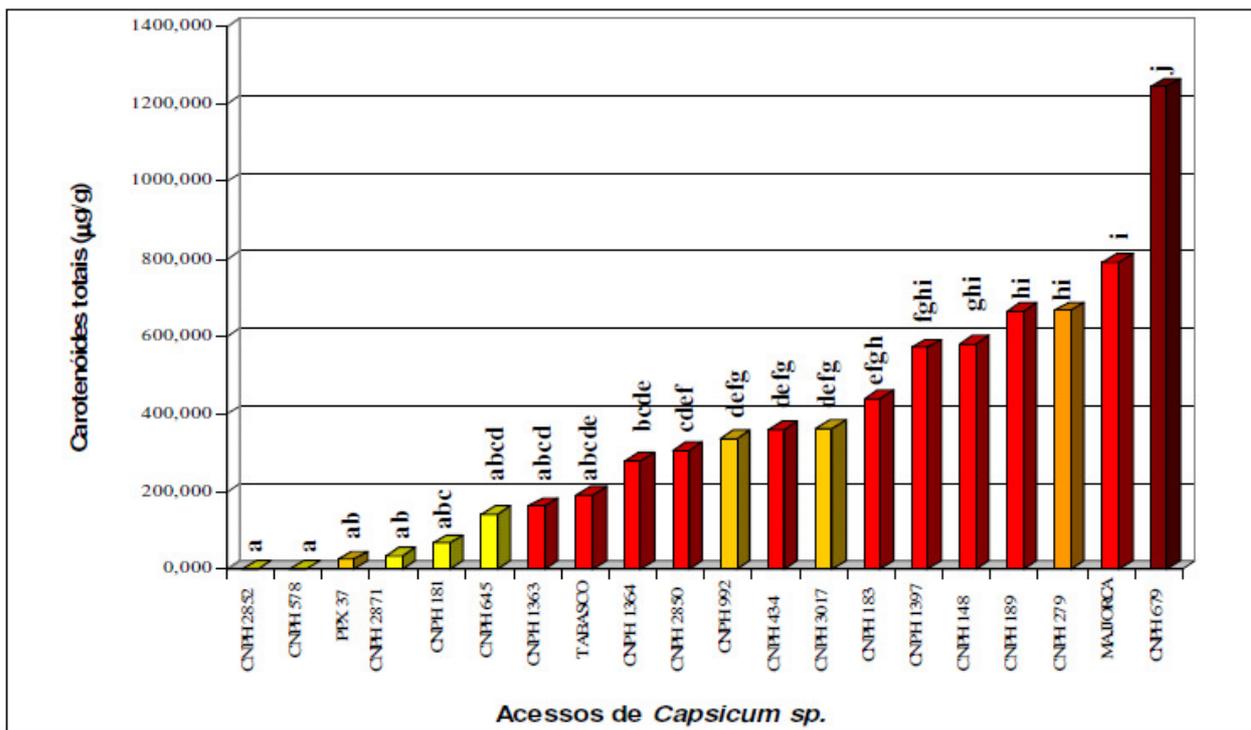


Figura 3. Carotenóides totais em *Capsicum* em µg/g de massa fresca. Colunas indicadas com a mesma letra não diferiram pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

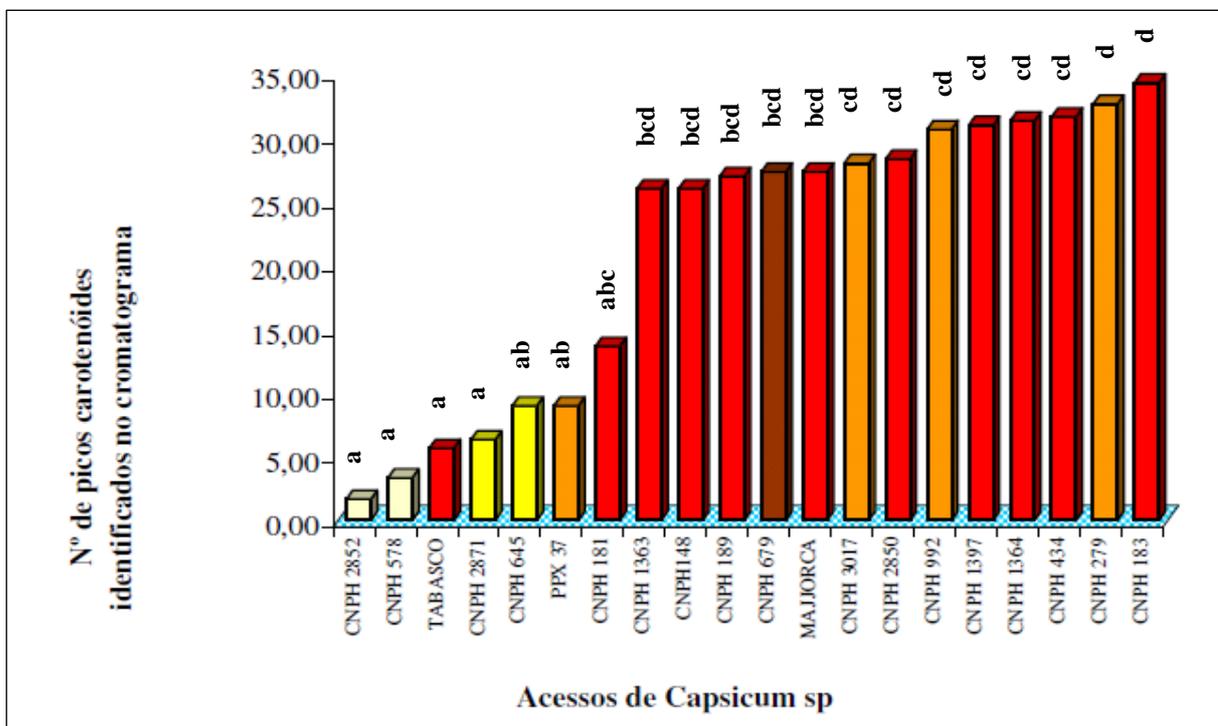


Figura 4. Perfil de carotenóides em *Capsicum*, relacionando o acesso com o número de picos encontrados em cada acesso. Colunas indicadas com a mesma letra não diferiram pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Tabela 1: Composição de carotenóides (%) em acessos de quatro espécies de *Capsicum*

CAROTENÓIDES	CNPH 645	CNPH 181	CNPH 3017	CNPH 992	CNPH 279	CNPH 183	CNPH 189	CNPH 148	MAJ	CNPH 2850	CNPH 434	CNPH 1364	CNPH 1363	CNPH 1397	CNPH 679
ANTHERAXANTINA		0,87	0,31							1,50					
NEOXANTINA	25,44	26,85	2,56	6,38	1,87	1,71									0,60
VIOLAXANTINA	21,96	33,25	1,66		3,40	2,04					3,67	0,25			1,90
CAPSANTINA /CAPSORUBINA						42,64	50,04	42,94	22,02	39,19	42,81	43,32	41,26	55,61	22,93
LUTEINA	28,75	20,79				4,32	8,79	5,15	3,56	6,79	3,54				1,04
ZEAXANTINA						1,19	1,36	0,97	1,08	0,94	1,81	1,04	2,26	0,62	2,97
β-CRIPTOXANTINA						0,73			3,10	2,63	5,54	2,48	0,65	1,18	1,46
α-CRIPTOXANTINA			9,68	10,70	15,34	2,69			1,40	0,81	0,76	0,92	0,68	0,53	
α-CAROTENO	2,75	1,77	36,03	31,16	30,46	3,90			5,00	2,37	3,83	4,53			2,97
β-CAROTENO			15,79	9,91	10,76	22,23			31,73	14,28	15,76	11,13	3,51	9,22	18,69
CLOROFILA															8,47
α + β-CAROTENO	2,75	1,77	51,82	41,07	41,22	26,13			36,73	16,65	19,59	15,83		9,22	21,66
OUTROS CAROTENÓIDES	21,10	16,47	33,97	41,85	38,18	18,57	39,82	50,93	32,12	31,50	22,27	36,33	51,64	32,86	38,97

Tabela 2: Conteúdo de carotenóide ($\mu\text{g/g}$) em *Capsicum sp.*

CAROTENÓIDES	CNPH 645	CNPH 181	CNPH 3017	CNPH 992	CNPH 279	CNPH 183	CNPH 189	CNPH 148	MAJ	CNPH 2850	CNPH 434	CNPH 1364	CNPH 1363	CNPH 1397	CNPH 679
ANTHERAXANTINA		0,59	1,14							4,61					
NEOXANTINA	36,37	18,09	9,31	21,50	12,50	7,49									12,01
VIOLAXANTINA	31,40	22,40	6,04		22,68	8,95					13,25	0,70			37,81
CAPSANTINA/ CAPSORUBINA						187,30	333,06	249,94	174,35	120,36	154,57	120,78	67,26	318,23	457,56
LUTEINA	41,12	14,00				18,97	58,48	3	28,16	20,84	12,79				20,66
ZEAXANTINA						5,23	9,04	5,67	8,53	2,88	6,55	2,91	3,68	3,52	59,19
β -CRIPTOXANTINA						3,19			24,52	8,07	20,01	6,91	1,06	6,75	29,13
α -CRIPTOXANTINA			35,20	36,05	102,43	11,80			11,08	2,48	2,75	2,55	1,11	3,02	
α -CAROTENO	3,93	1,19	130,94	105,00	203,46	17,12			39,58	7,27	13,85	12,62			59,33
β -CAROTENO			57,37	33,38	71,88	97,67			251,16	43,86	56,91	31,03	5,72	52,74	373,02
α + β -CAROTENO			188,31	138,38	275,34	114,79			290,74	51,13	70,76	43,65	5,72	52,74	432,35
CLOROFILA															169,02
OUTROS CAROTENÓIDES	30,18	11,10	123,44	141,00	254,99	81,57	265,06	296,43	254,30	96,74	80,43	101,29	84,17	188,03	777,63

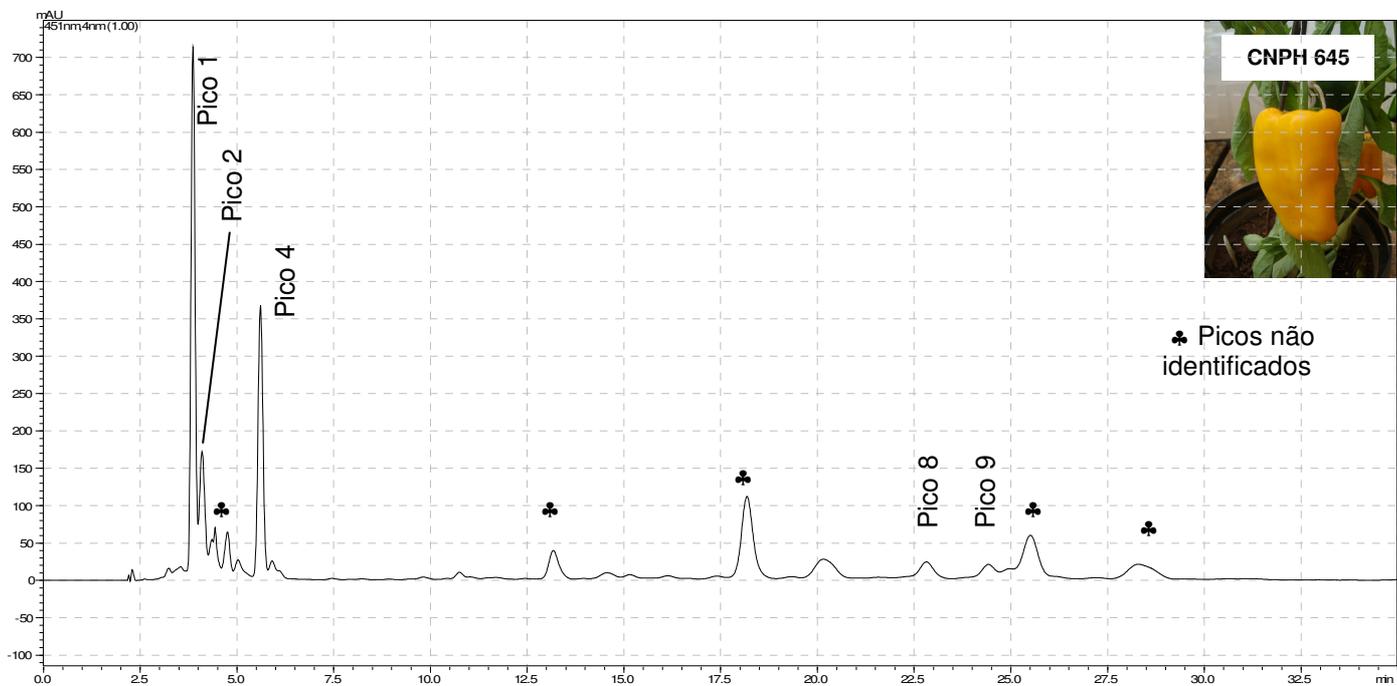
Tabela 3: Conteúdo de carotenóide ($\mu\text{g/g}$) em *Capsicum sp.* com base na curva de calibração de β -caroteno.

Carotenóides	C.c	C.c	C.a	C.a	C.f
	CNPH	CNPH	CNPH	CNPH	CNPH
	2852	578	181	645	2871
NEOXANTINA					
VIOLAXANTINA			3,77	4,23	0,25
CAPSANTINA					
LUTEINA	0,03	0,28	4,92	5,75	5,80
ZEAXANTINA					
β -CRIPTOXANTINA					
α -CRIPTOXANTINA					
α -CAROTENO				1,18	
β -CAROTENO				0,54	
α + β -CAROTENO				1,72	
CLOROFILA					

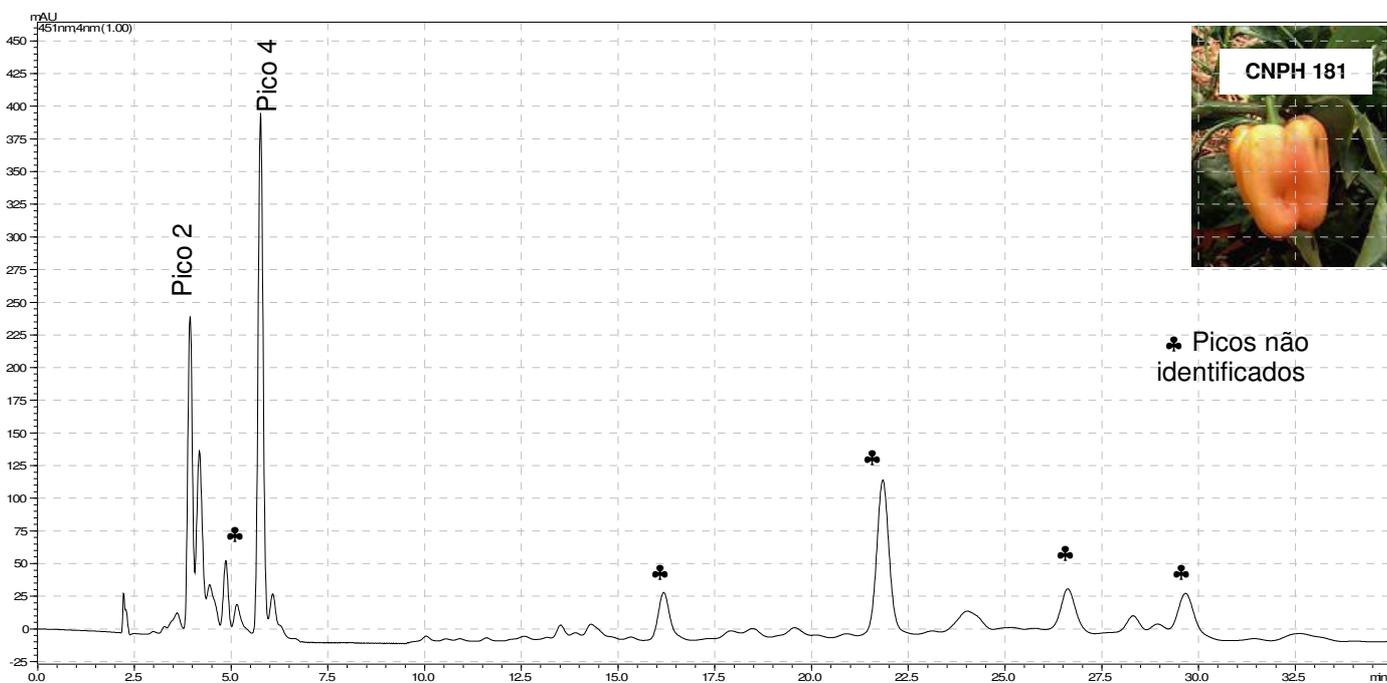
Carotenóides	C.b	C.b	C.b	C.a
	CNPH	CNPH	CNPH	PPX
	3017	992	279	37
NEOXANTINA				
VIOLAXANTINA				
CAPSANTINA				3,48
LUTEINA				0,61
ZEAXANTINA				
β -CRIPTOXANTINA				
α -CRIPTOXANTINA	14,18	17,30	24,55	
α -CAROTENO	35,44	42,92	40,70	
β -CAROTENO	19,95	16,64	19,95	
α + β -CAROTENO	55,39	59,56	60,64	
CLOROFILA				

Carotenóides	C.a	C.a	C.a	C.c	C.c	C.b	C.b	C.b	C.f	C.c
	CNPH	Majjorca	CNPH	CNPH	CNPH	CNPH	CNPH	CNPH	Tabasco	CNPH
	183		189	434	2850	1397	1363	1364		679
NEOXANTINA										0,08
VIOLAXANTINA								1,46		4,23
CAPSANTINA	44,54	46,05	121,88	53,52	32,68	132,66	26,31	70,12	4,37	80,06
LUTEINA	5,35	5,35	5,99	4,54	3,45					3,31
ZEAXANTINA	2,85	2,11	2,22		0,71		0,85	2,74		9,60
β -CRIPTOXANTINA	0,94	1,42		5,87	1,61	3,72		4,63		4,75
α -CRIPTOXANTINA	1,99	4,33		1,68	0,56	1,72		1,71		
α -CAROTENO	5,01	10,54	8,94	5,03	3,02					9,62
β -CAROTENO	21,77	58,36	1,69	16,91	10,65	29,56	1,39	18,33	20,24	62,32
α + β -CAROTENO	26,78	68,90	10,63	21,93	13,66	29,56	1,39	18,33	20,24	71,94
CLOROFILA										25,80

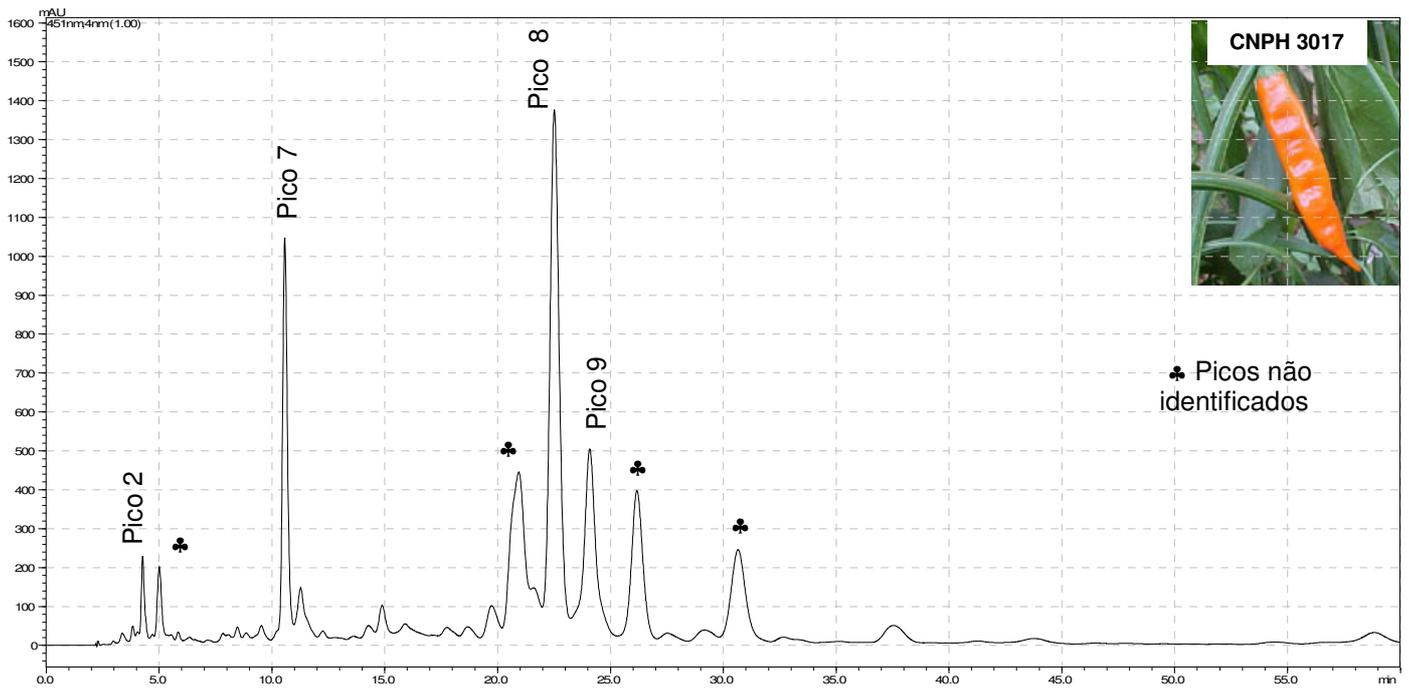
Anexo I: Perfil de carotenóides nos acessos de *Capsicum* analisados. Os picos foram codificados como: (1) violaxantina; (2) neoxantina; (3) capsantina; (4) luteína; (5) zeaxantina; (6) α -criptoxantina; (7) β -criptoxantina; (8) α -caroteno; (9) β -caroteno e (10) clorofila.



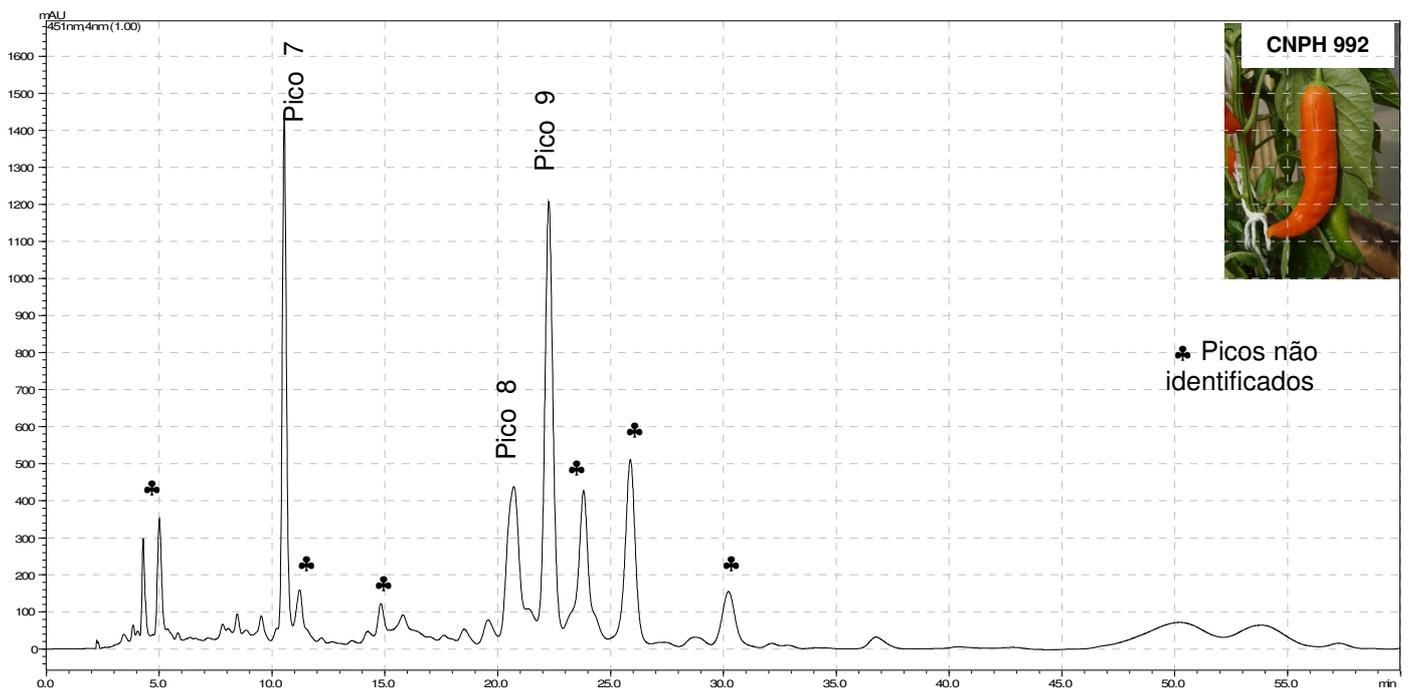
Capsicum annuum CNPH 0645



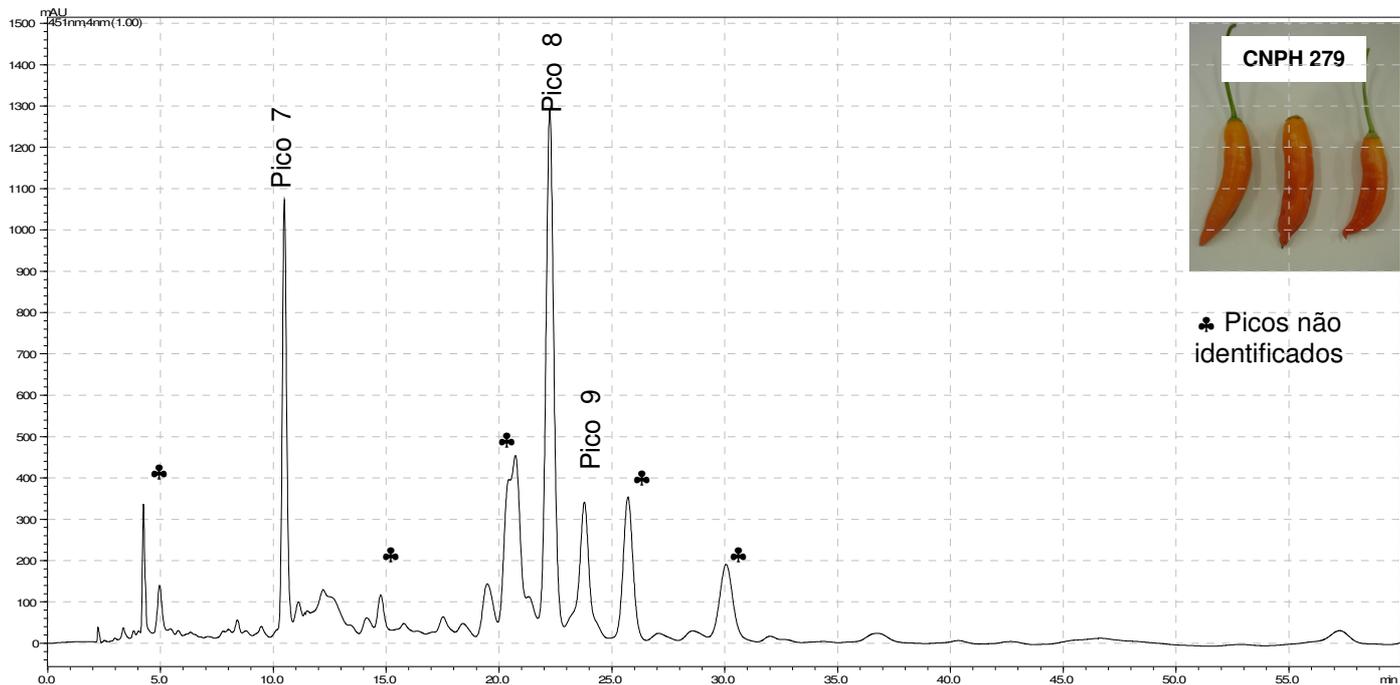
Capsicum annuum CNPH 0181



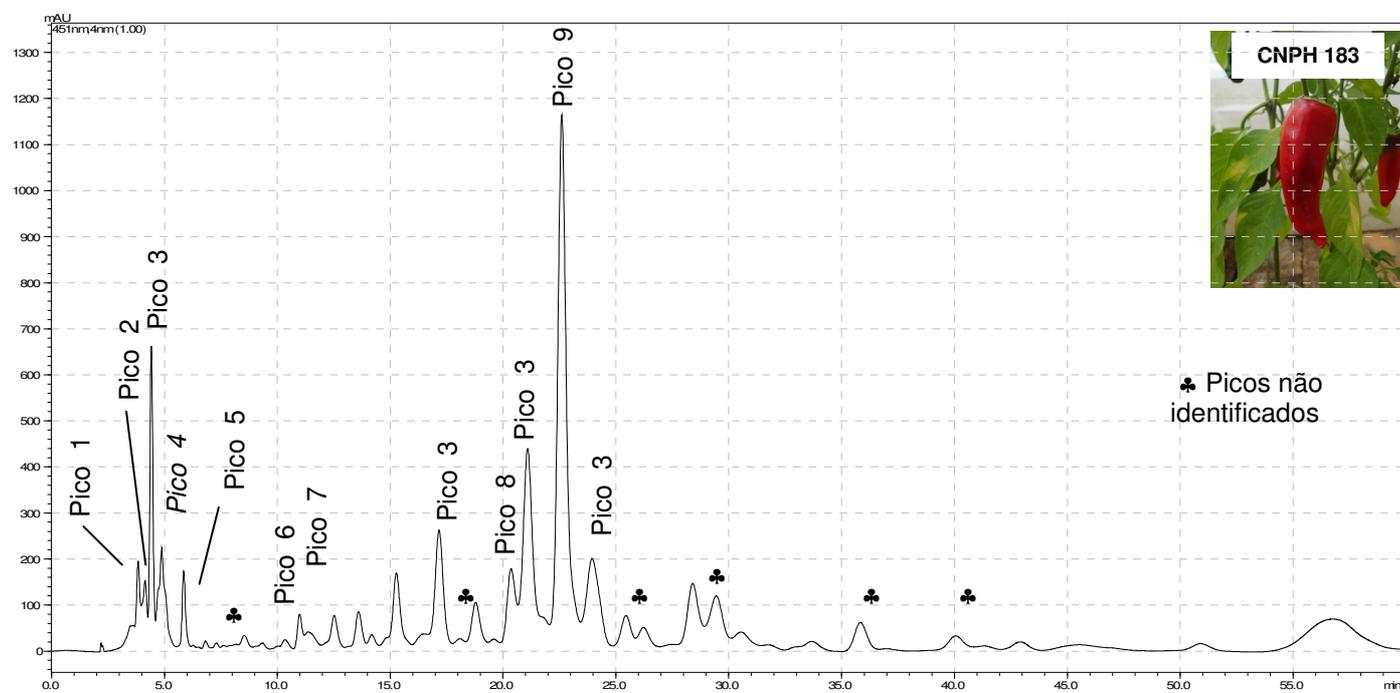
Capsicum baccatum CNPH 3017



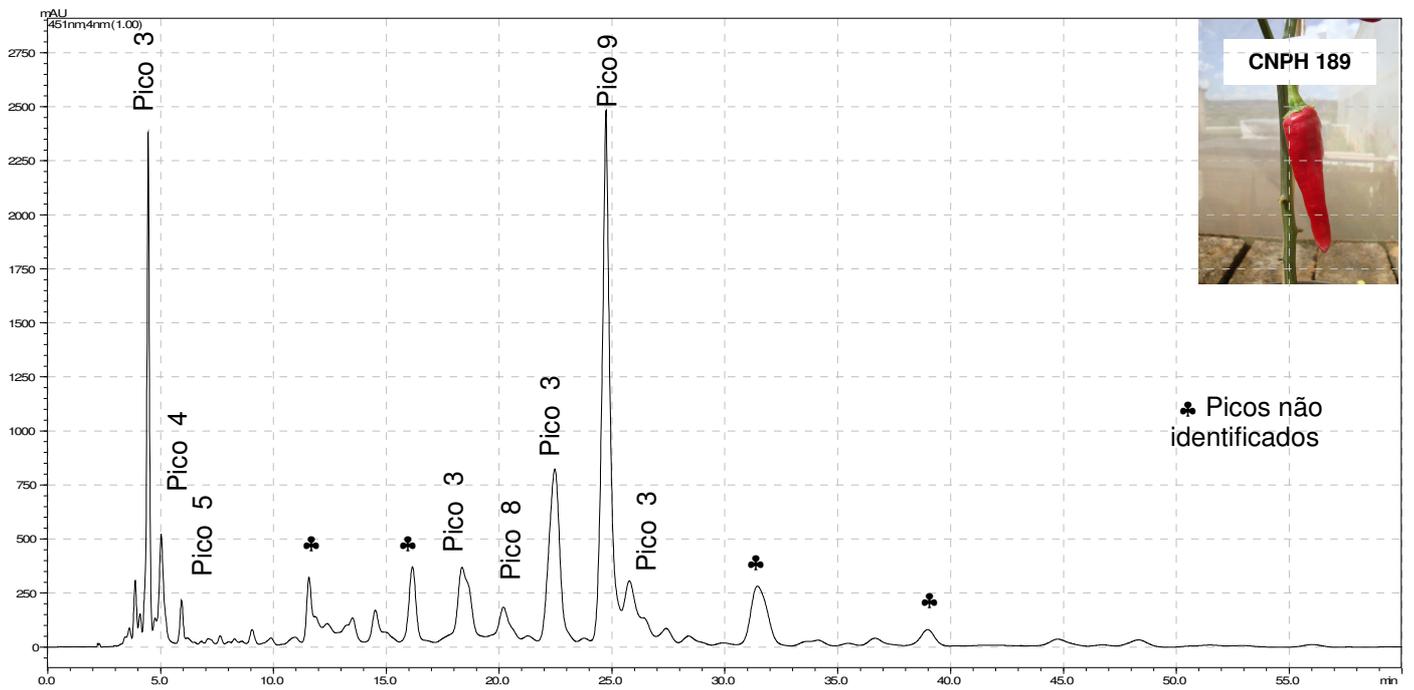
Capsicum baccatum CNPH 0992



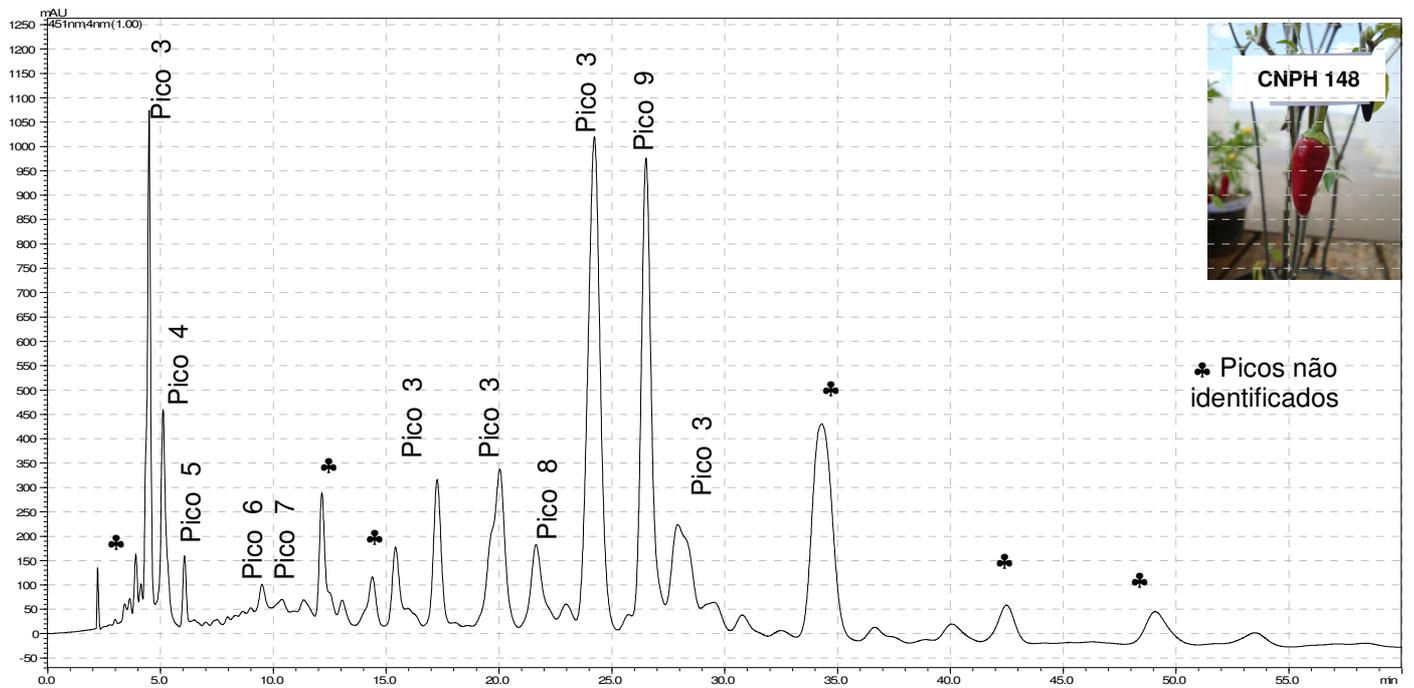
Capsicum baccatum CNPH 0279



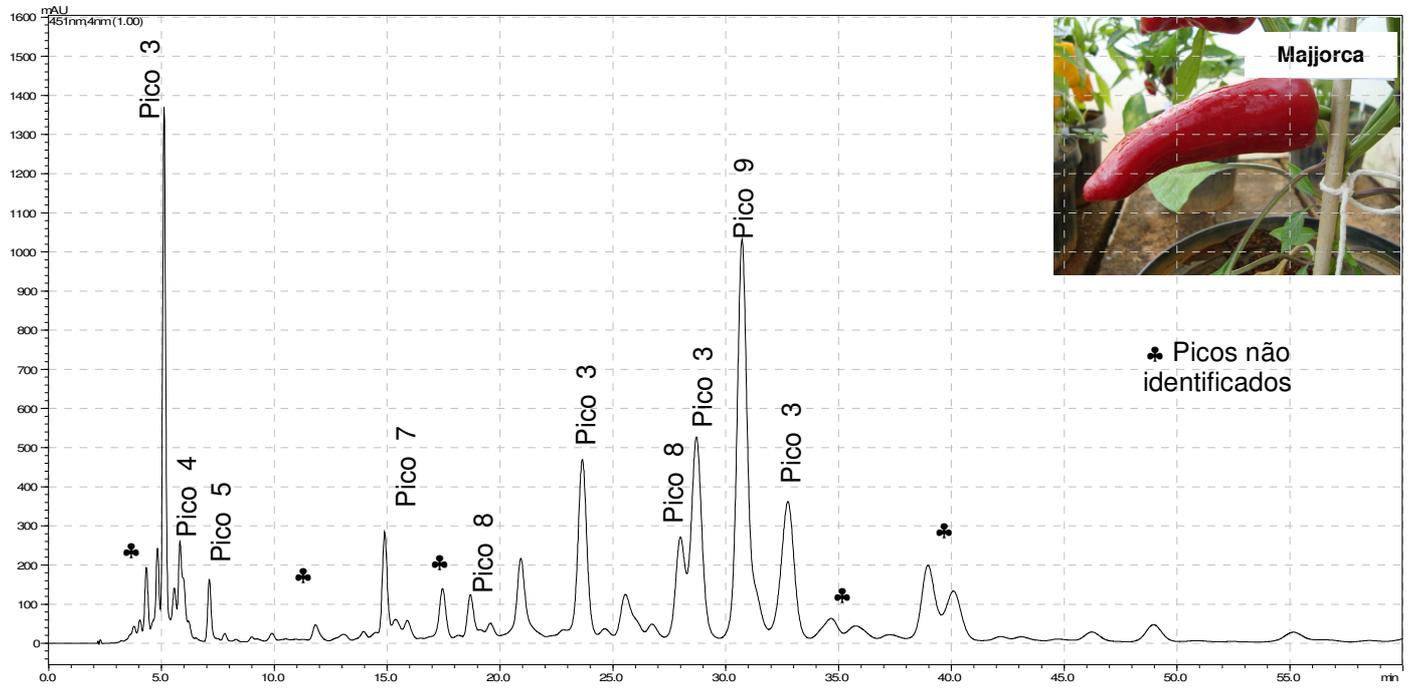
Capsicum annuum CNPH 0183



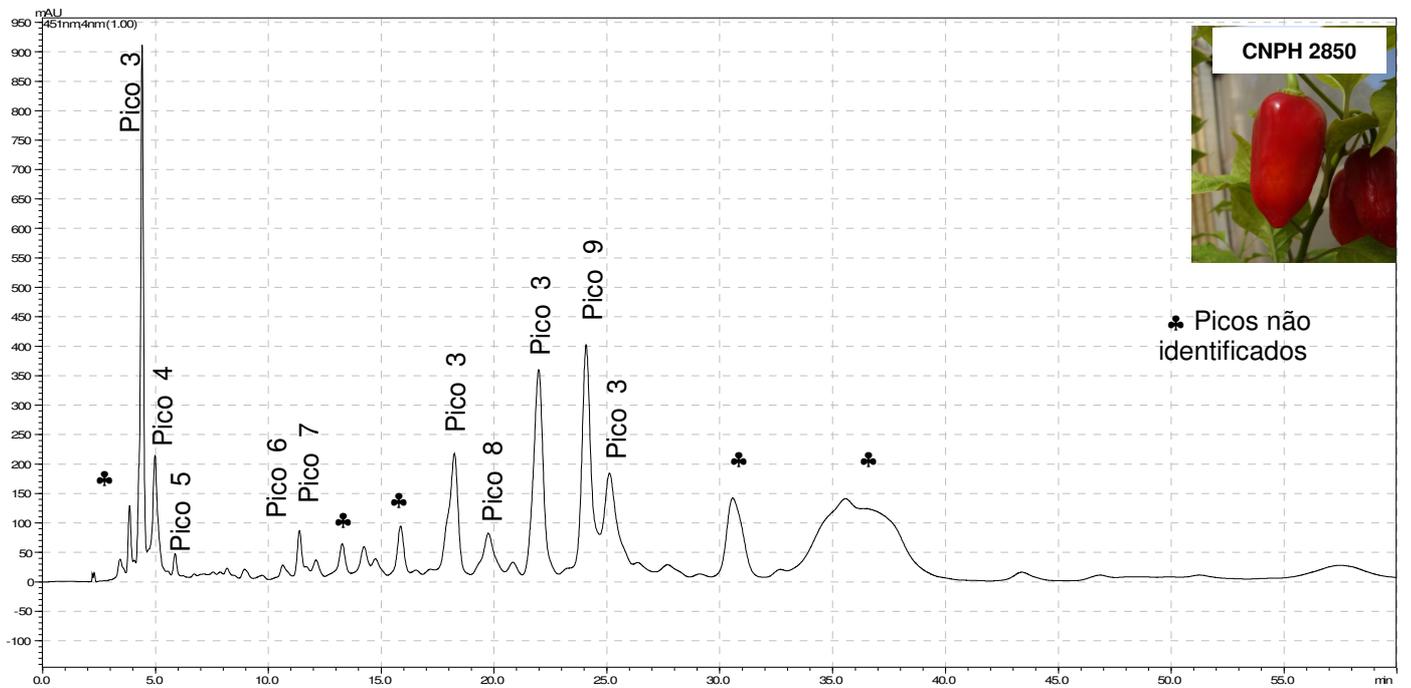
Capsicum annuum CNPH 0189



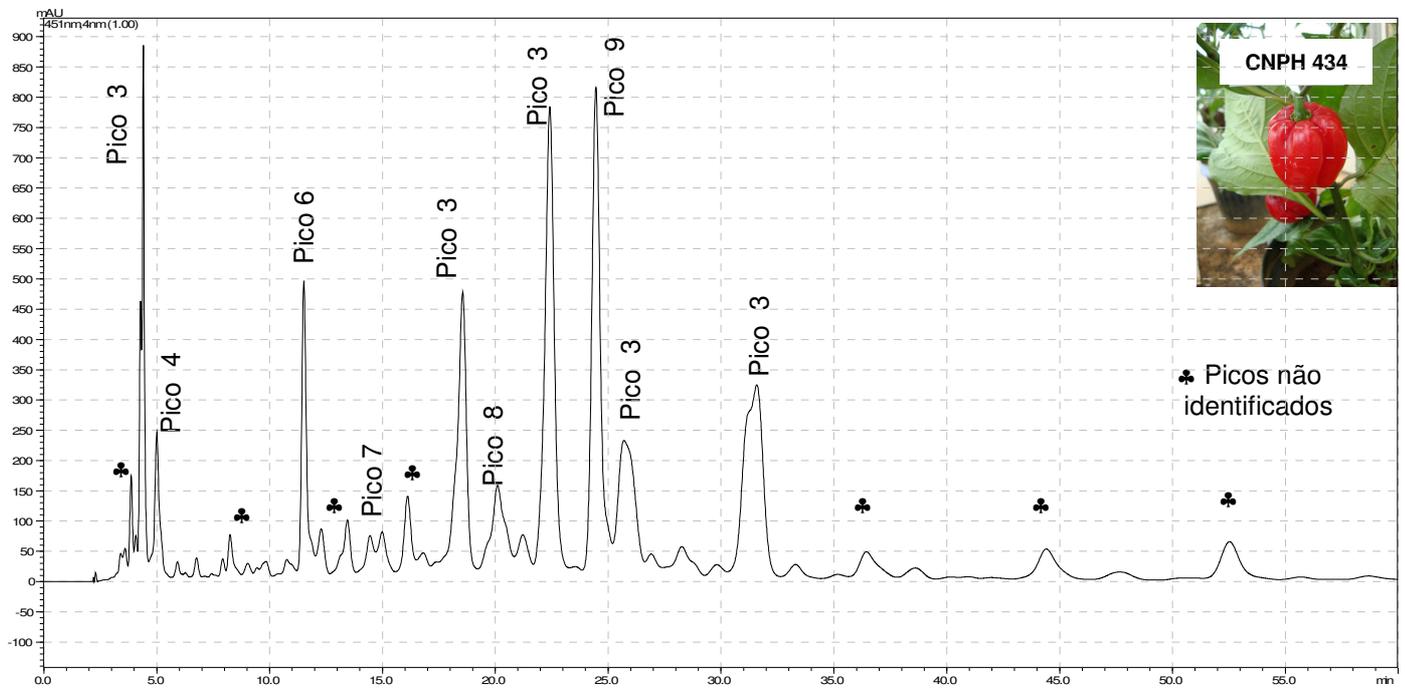
Capsicum annuum CNPH 0148



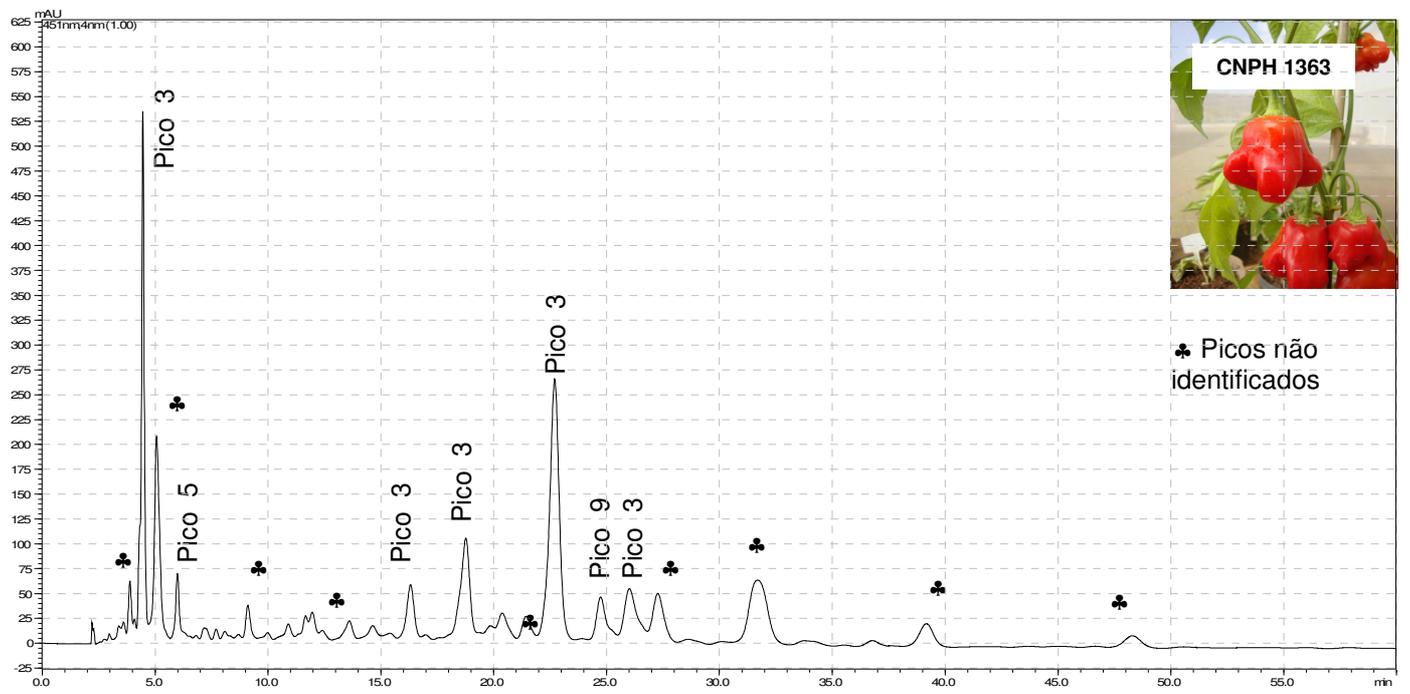
Capsicum annuum 'Majjorca'



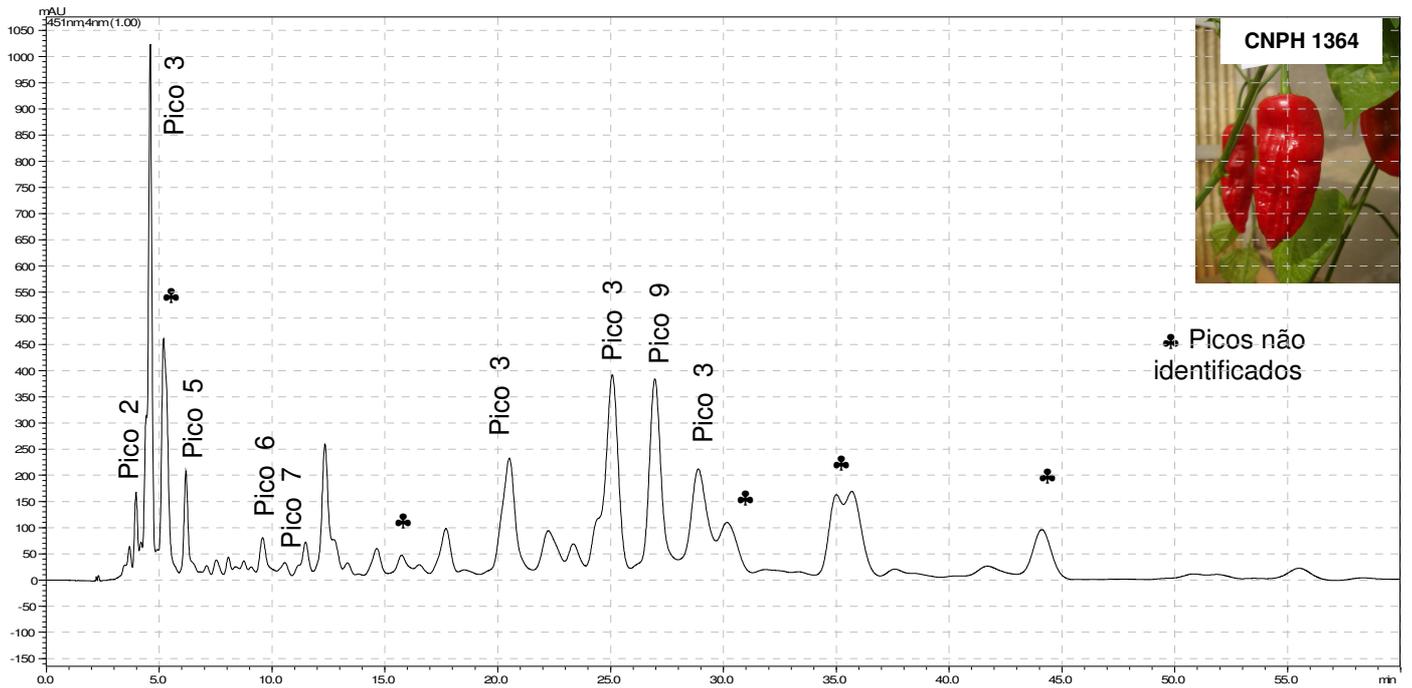
Capsicum chinense CNPH 2850



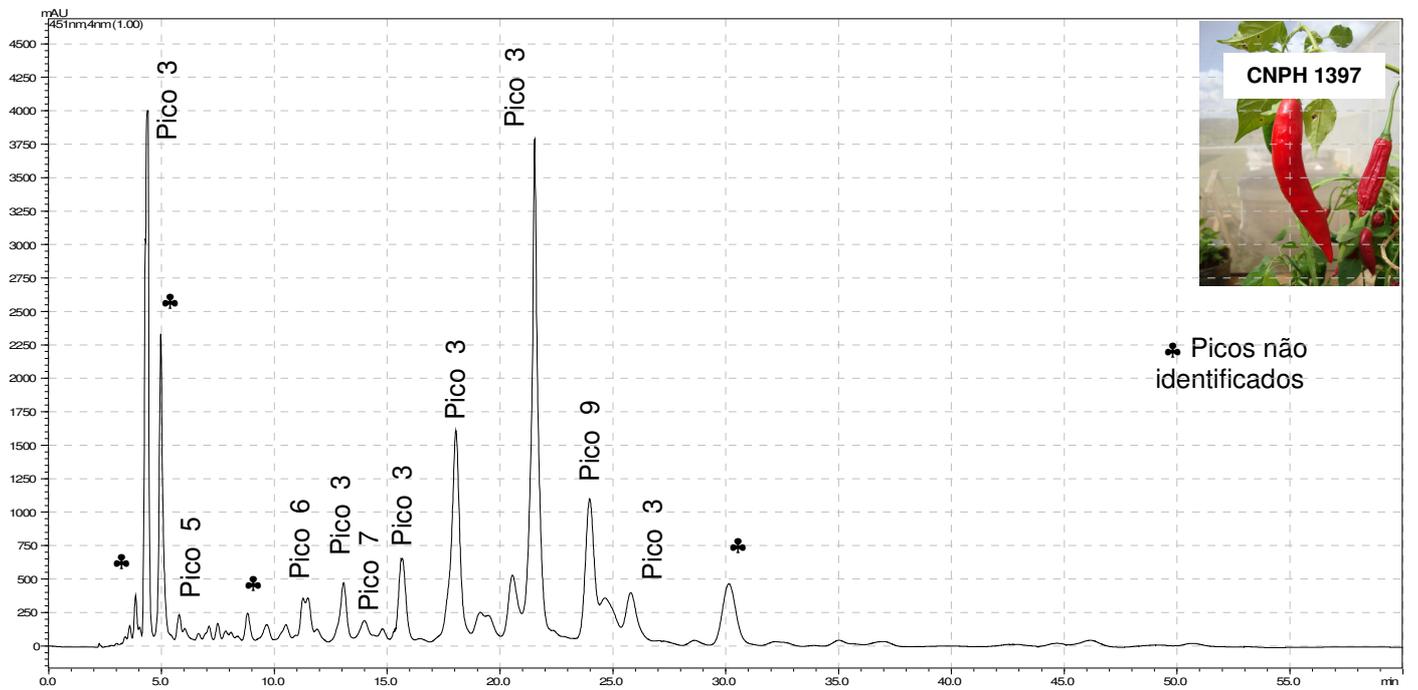
Capsicum chinense CNPH 0434



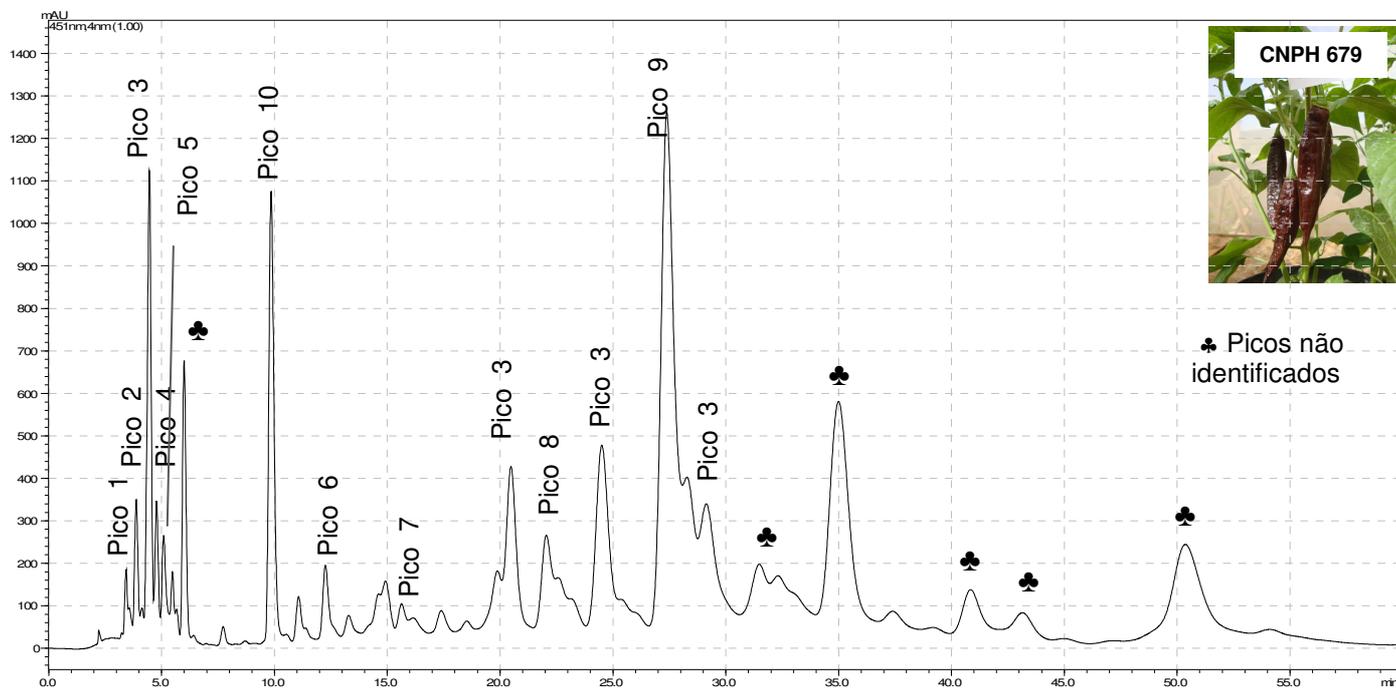
Capsicum baccatum CNPH 1363



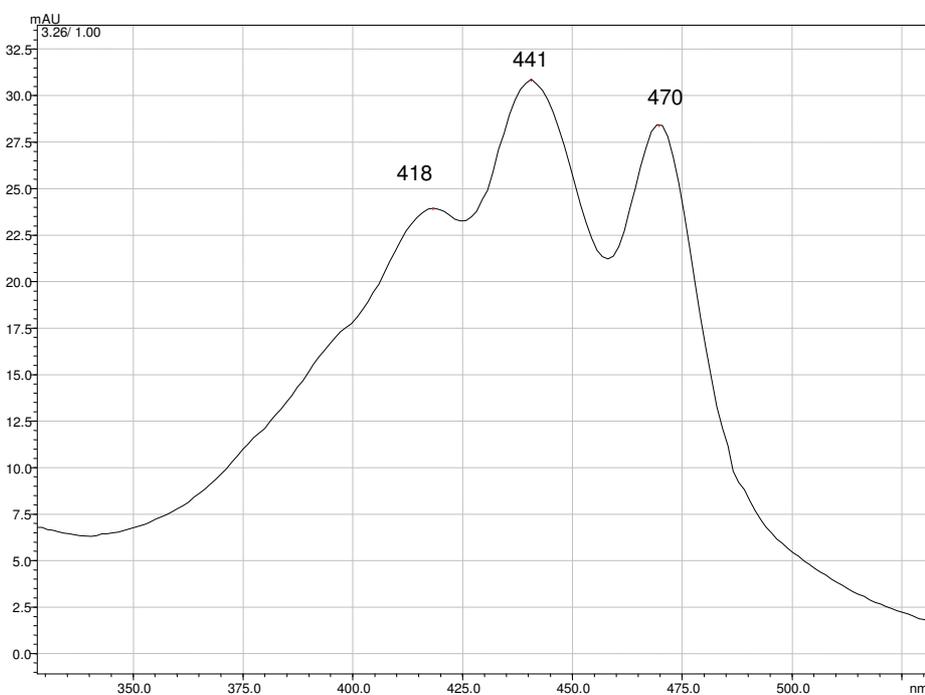
Capsicum baccatum CNPH 1364



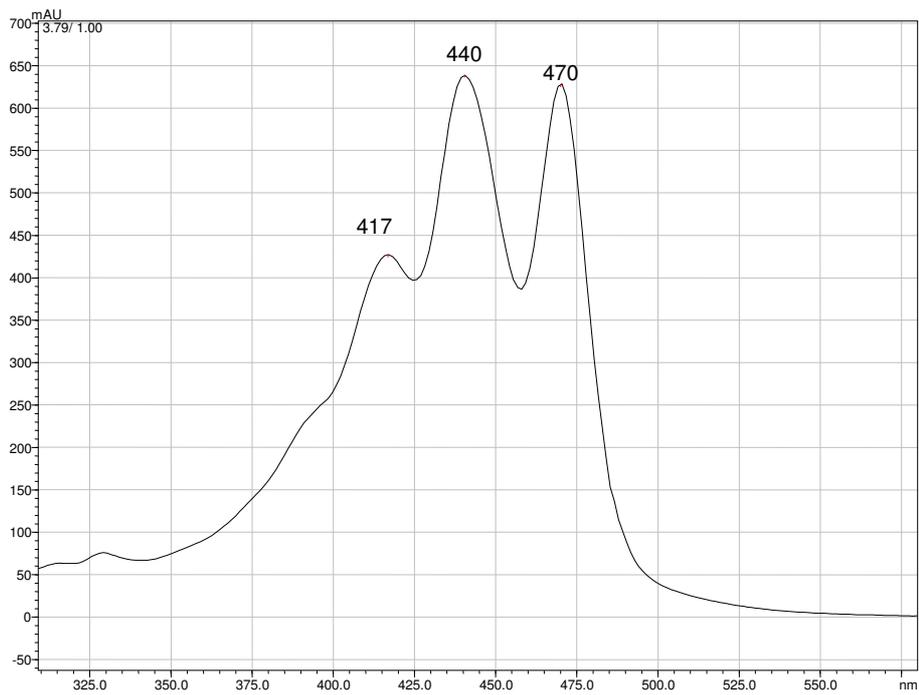
Capsicum baccatum CNPH 1397



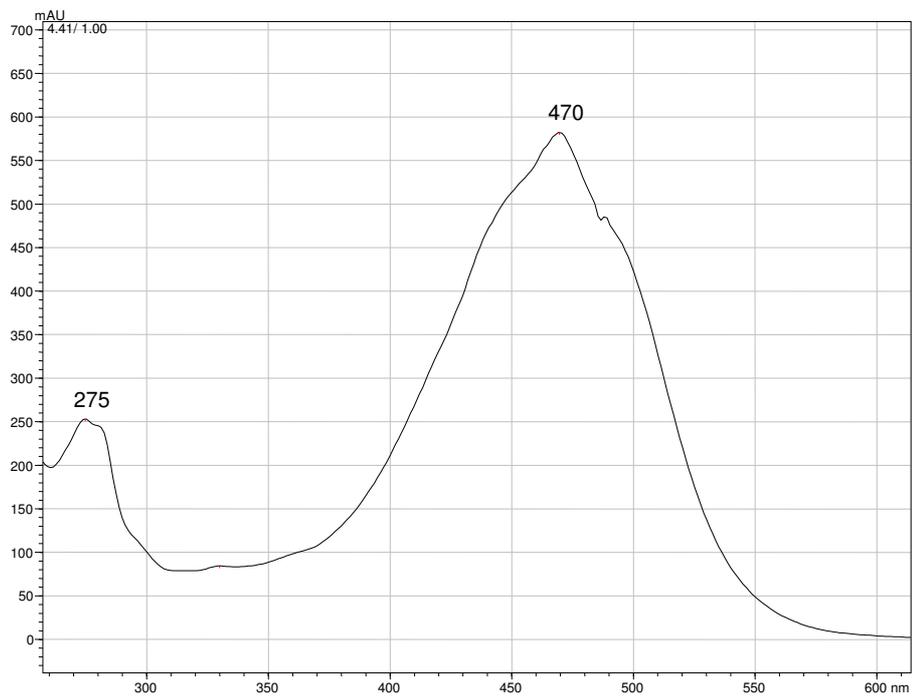
Capsicum chinense CNPH 0679



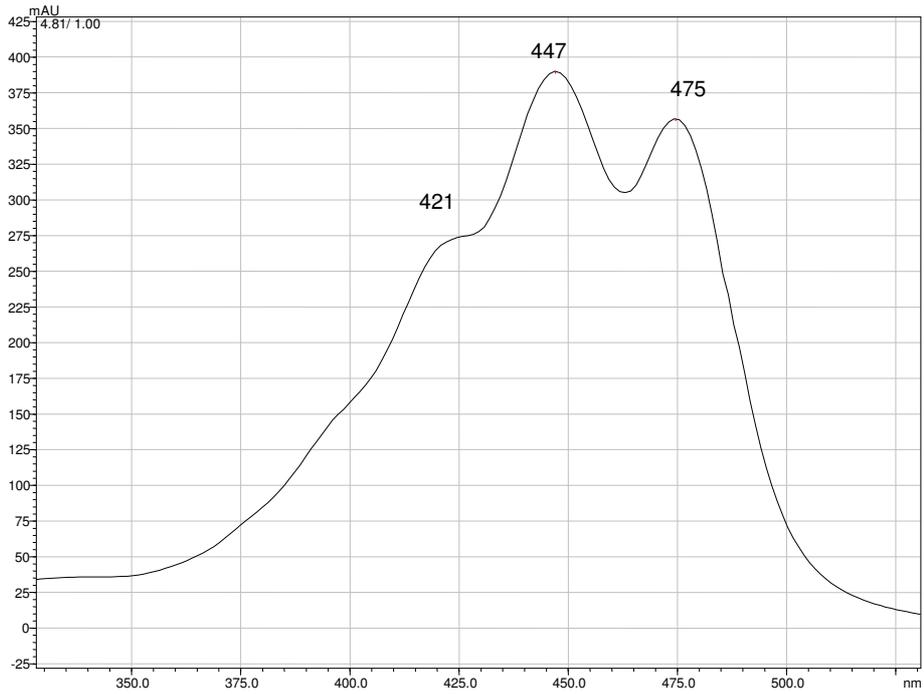
Pico 1: Neoxantina (418, 441, 470) %III / II = 85



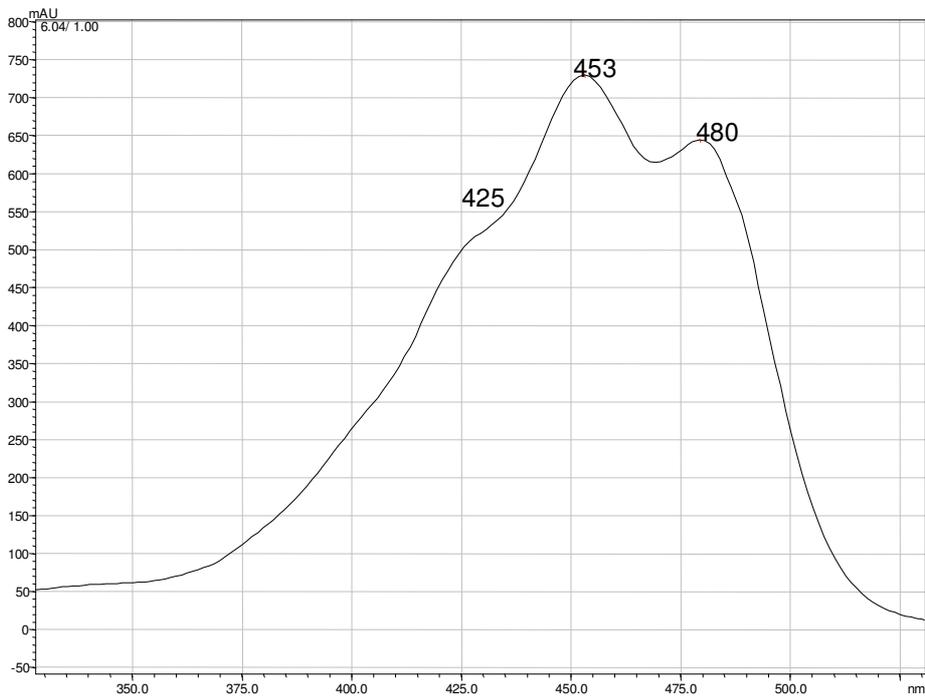
Pico 2: Violaxantina: (417, 440, 470) %III / II = 98



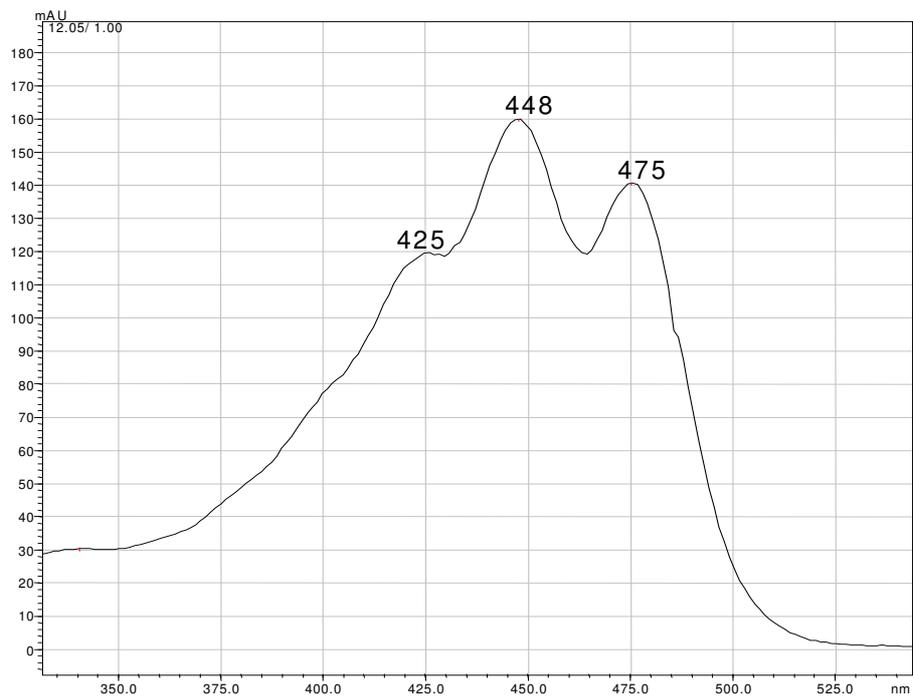
Pico 3: Capsantina



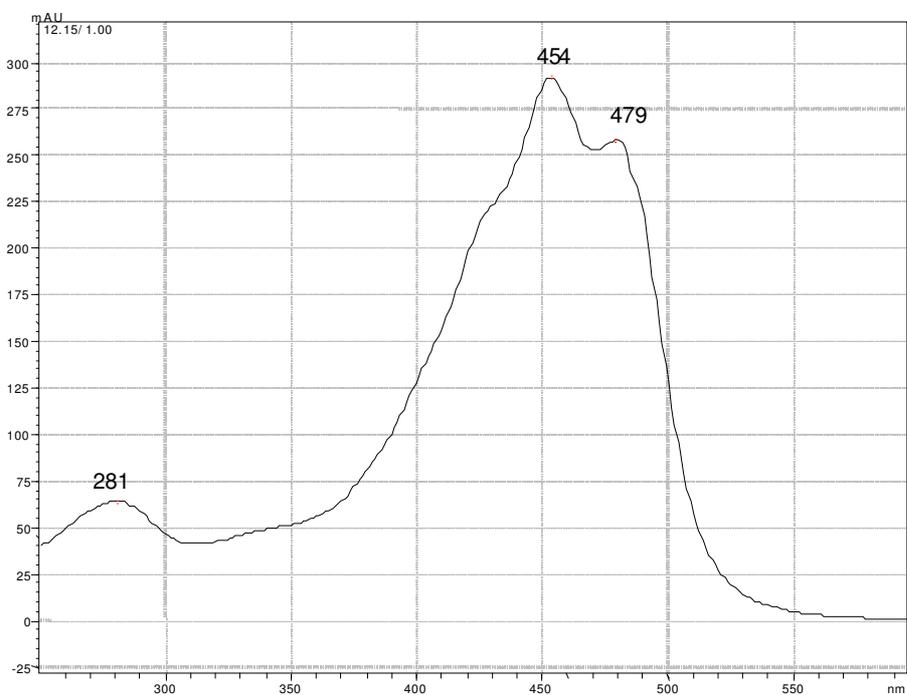
Pico 4: Luteína: (421, 447, 475) %III / II = 60



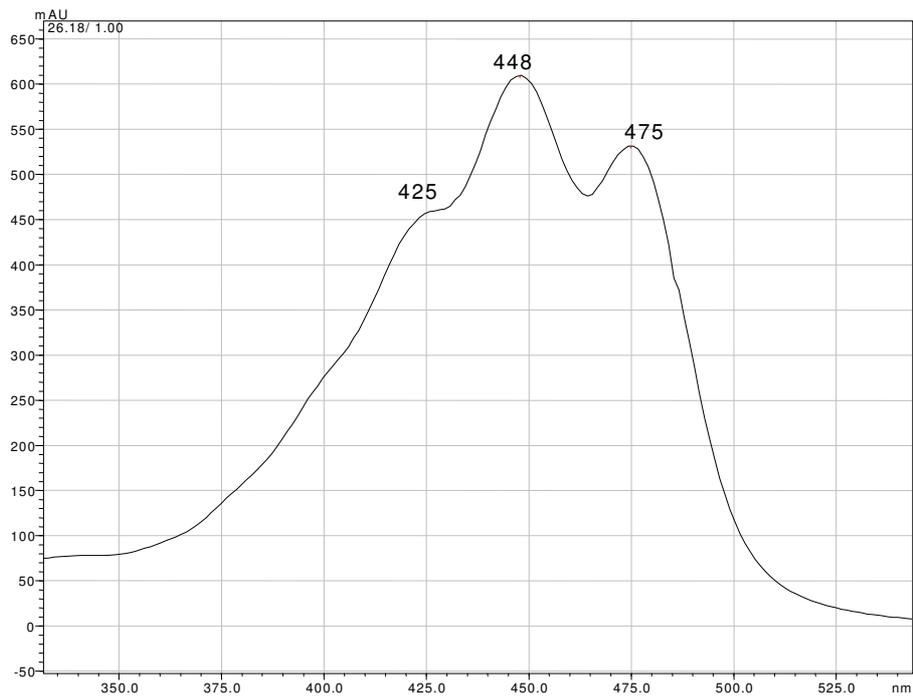
Pico 5: Zeaxantina: (425, 453, 480) %III / II = 25



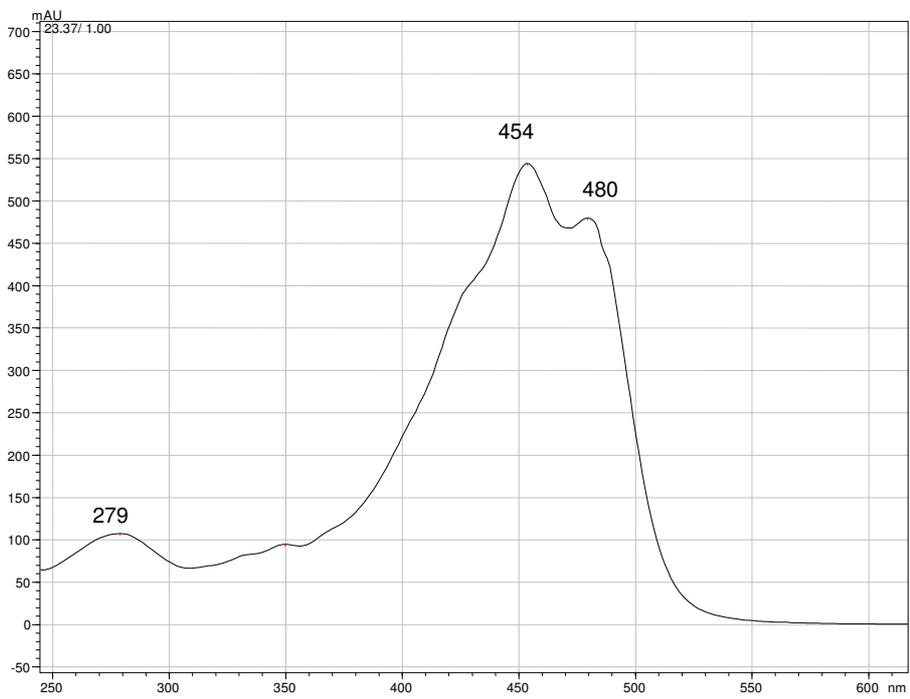
Pico 6: α -Criptoxantina: (425, 454, 480) %III / II = 25



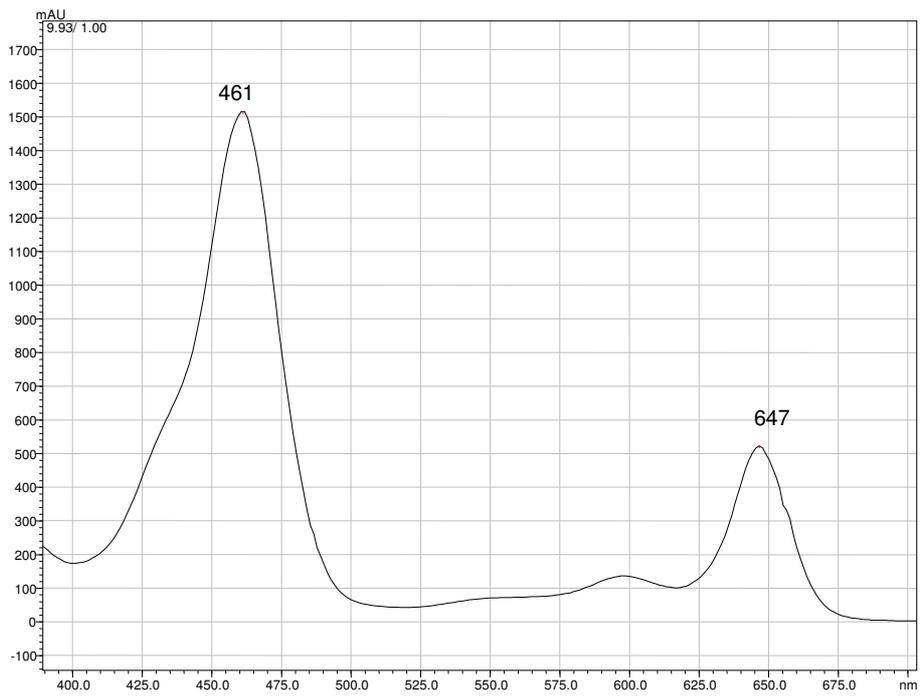
Pico 7: β -Criptoxantina: (425, 453, 480) %III / II = 25



Pico 8: α - Caroteno: (425, 448, 475) %III / II = 25



Pico 9: β - Caroteno: (279, 454, 480) %III / II = 25



Pico 10: Clorofila

6. Referências Bibliográficas

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p.233-243, 2006.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ- AMAYA, D. B. Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n.21, p.3652-3658, 2009.

BASU, S. K.; KRISHNA, A. *Capsicum*: historical and botanical perspectives. In: Khrisna, A (ed). **Capsicum**: the genus *Capsicum*. New York: Taylor e Francis. 2003, p. 1-23.

BIANCHETTI, L. B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil**. 1996. 174 f. Dissertação de Mestrado em Botânica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília- UnB, Brasília.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. Carotenóides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum*). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 3, p.283-288, 1998.

BIACS, P. A.; DAOOD, H. G.; PAVISA, A.; HADJU, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L. var. Sz-20). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 2, p.350-353, 1989.

BILGER, W.; FISAHN, J; BRUMMET, W.; KOSSMANN, J.; WILLMITZER, L. Violaxanthin cycle pigment contents in potato and Tobacco plants with genetically reduced photosynthetic capacity. **Plant Physiology**, v. 108, p.1479-1486, 1995.

BOROVSKY, Y.; PARAN, I. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 2, p.235-240, 2008.

BOSLAND, P. W. *Capsicums*: Innovative uses of an ancient crop. In: J. Janick (ed.), **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996, p.479-487.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers**: vegetable and spice *Capsicums*. Wallingford: CAB International, 1999. 204 p.

BOTELLA-PAÍVA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v.126, p.369-381, 2006.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, p.1551-1558, 1995.

CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de Conversão de Carotenóides provitamínicos A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 571-578, 2005.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: Ribeiro, C. S. C.; Lopes, C. A.; Carvalho, S. I. C.; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2008. p.39-53.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas de gênero Capsicum no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, série Documentos. n. 94, 2006. 27p.

CARVALHO, S. I. C.; RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. 'BRS Mari': Nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p.571-573. 2009.

CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**, v.10, n. 113, p. 8-13. 1984.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, suplemento.1, p.51-59, 2010.

FISHER, C.; KOCIS, J. Separation of paprika pigments by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, p.55-57, 1987.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M.; The biosynthesis and nutritional uses of Carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p.228-265, 2004.

GIULIANO, G.; AL-BABILI, S.; LINTIG, J, v. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. **Trends in Plant Science**, v.8, n.4, p.145-149, 2003.

GIULIANO, G.; DIRETTO, G. Of chromoplasts and chaperones. **Trends in Plant Science**, v.12, n.12, p.529-531, 2007.

GONÇALVES, E. M. D. Produção de pimenta em assentamento rurais no município de Campo Florido- MG. **I Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum* sp.)**. p.1-17, 2004. CD-ROM.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. London: Chapman and Hall, 1991, 351p.

HA, S. H.; KIM, J. B.; PARK, J. S.; LEE, S. W. E.; CHO, K. J. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.3135-3144, 2007.

HARVELL, K., BOSLAND, P. W. The environment produces a significant effect on pungency of chiles. **HortScience**, v. 32, p.1292, 1997.

HEINONEN, M. I.; OLLILAINEN, V.; LINKOLA, E. K.; VARO, P. T.; KOIVISTOINEN, P. E. Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p.655-659, 1989.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; GUEVARA, R. G. L.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.9, p.3857-3864. 2000.

IBGE, Censo Agropecuário/96. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA; <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=2&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1> acessado em 20/02/2010.

LEMOS, E. E. P. Ácido Abscísico. *In*: Cid, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, 2000, p.159-180.

LÚCIO, A. D.; SOUZA, M. F.; HELDWEIN, A. B.; LIEBERKNECHT, D.; CARPES, R. H.; CARVALHO, M. P. Tamanho da amostra e método de amostragem para avaliação de características do pimentão em estufa plástica. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p.180-184. 2003.

LUZ, F. J. F. **Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70f. Tese de Doutorado em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista- UNESP. Jaboticabal-SP.

MAOKA, T; MOCHIDA, K.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; ENJO, F.; OGATA, M.; NOBUKUNI, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. **Cancer Letters**, v.172, p.103-109, 2001.

MATSUFUJI, H.; NAKAMURA, H.; CHINO, M.; TAKEDA, M. Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3468-3472, 1998.

MATUS, Z.; DELI, J.; SZABOLCS, J. Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of β -cryptoxanthin 5, 6-epoxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p.1907-1914, 1991.

MOSS, G. P.; WEEDON, B.C.L. Chemistry of the carotenoids. *In*: Goodwin, T. W. **Chemistry and biochemistry of plants pigments**, 2. ed., v.1, London: Academic Press, 1976, p. 149-224.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v.96, p.129-133, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in food**. Washington: International Life Sciences Institute Press, 2001. 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. ; KIMURA, M.; AMAYA- FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenóides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF, 2008, 100p.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectiva e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, v. 27, n.235, p.7-15, 2006.

SANDMANN, G.; ROMER, S.; FRASER, P. D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. **Metabolic Engineering**, v.8, p. 291–302, 2006.

SCHIEDT, K.; LIAAEN-JENSEN, S. Isolation and Analysis. *in*: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) **Carotenoids**, Basel: Birkhäuser Verlag, 1995. v. 1A, p. 81-108.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: Occurrence, Biochemical Activities, and Bioavailability. *In*: Packer, L; Hiramatsu, M; Yoshikawa, T. **Antioxidant food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press. 1999. p.183-198.

SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C. dos S. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.

USDA, NRCS. 2010. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 23 August 2010). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

VILELA, N. J.; RIBEIRO, C. S. C; MADAIL, J. C. M. **Eficiência técnico-econômico de quatro sistemas de produção de pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, série comunicado técnico, n. 56, 2008. 7p.

YOON, J. B.; YANG, D. C.; DO, J. W.; PARK, H. G. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. **Breeding Science**, v. 56, n. 1, p. 31-38, 2006.

CAPÍTULO II

Variabilidade estrutural do gene codificador da Capsantina Capsorubina Sintase (CCS) em acessos de quatro espécies de *Capsicum* com diferentes cores de fruto.

RESUMO

Há uma grande diversidade fenotípica em relação à coloração de fruto maduros no gênero *Capsicum*. Os padrões da cor dos frutos maduros variam desde o branco até o vermelho intenso, passando por diferentes intensidades de amarelo, laranja, roxo e marrom chocolate. Genes codificadores de enzimas da via biossintética dos pigmentos carotenóides têm sido investigados como potenciais marcadores funcionais para cor de fruto maduro em *C. annuum*. O gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase (CCS) tem sido um dos principais alvos destes estudos. A enzima CCS está envolvida na síntese dos principais carotenóides (capsantina e capsorubina) que estão relacionados com a típica coloração vermelha dos frutos maduros de *Capsicum*. No presente trabalho, o DNA genômico foi extraído de 24 acessos pertencentes a quatro espécies: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*. “Primers” específicos foram sintetizados baseados nas informações disponíveis no GenBank. Esses “primers” foram usados para se acoplar na região promotora e também na região codificante do gene CCS, usando DNA genômico (extraído de todos os acessos) como molde. O par de “primer” para PCR (‘CCSpro1for’ e ‘CCSpro1rev’) amplificou um amplicon de 900 pb específico do promotor. O segundo par de “primer” (PAL 1D’ e ‘PAL 7R’) amplificou um amplicon de 1476 bp específico da região codante de *C. annuum*. O amplicon da região codante se mostrou monomórfico. Este amplicon foi analisado via sequenciamento direto. Nenhum polimorfismo ligados à cor de fruto foi encontrado. Nenhum amplicon associado à região do promotor foi obtido, usando como molde DNA genômico extraído dos acessos de *C. annuum* ‘CNPH 0181’ e ‘CNPH 0645’ (ambos de coloração de fruto amarela). Um único amplicon (de tamanho variável) foi obtido com o par de primer dirigido à região promotora do gene CCS, usando DNA genômico de todos os acessos de frutos vermelhos e também de um acesso de fruto amarelo (*C. frutescens* ‘CNPH 2871’). O tamanho do amplicon do promotor apresentou uma

associação espécie-específica com o seguinte padrão (1) um amplicon de 920 bp foi encontrado, exclusivamente, em acessos de *C. annuum*; (2) um amplicon de 998 bp foi observado apenas em acessos de *C. baccatum* e *C. frutescens*; e (3) um amplicon de 1117 bp foi observado na maioria dos acessos de *C. chinense* mas, também, em um acesso, tentativamente, classificado, como *C. frutescens*. O presente trabalho mostrou a presença de variabilidade na estrutura molecular da região promotora do gene CCS nas diferentes espécies e acessos de *Capsicum* analisados. Esta informação pode ser útil em sistemas de identificação de espécies/cultivares bem como em seleção assistida.

ABSTRACT

There is a wide range of phenotypic variability in relation to mature fruit color in the genus *Capsicum*. Mature fruit color patterns range from white to an intense red color, encompassing different shades of yellow, orange, purple, and chocolate brown. Genes encoding enzymes of the carotenoid pigments biosynthetic pathway have been investigated as potential functional markers for mature fruit color in *C. annuum*. The gene encoding the Capsanthin-capsorubin sintase (CCS) has been one of the major targets in those studies. The enzyme CCS is involved in the synthesis of the most important carotenoids (capsanthin and capsorubin), which are related to the typical mature red fruit color of *Capsicum*. In the present work, genomic DNA was extracted from 24 accessions belonging to four species: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, and *C. baccatum*. Specific primers were synthesized based upon genetic information available at the GenBank. These primers were designed to target both the promoter and the coding regions of the CCS gene using genomic DNA (extracted from all accessions) as template. The PCR primer pair ('CCSpro1for' and 'CCSpro1rev') amplified an amplicon of 900 bp specific for the promoter. The second PCR primer pair ('PAL 1D' e 'PAL 7R') amplified an amplicon of 1476 bp specific for the coding region of the *C. annuum*. The coding region amplicon showed as monomorphic. This amplicon was analyzed by direct sequencing. No polymorphism linked to the fruit color was found. No amplicon corresponding to the promoter region was obtained using DNA from the *C. annuum* accessions 'CNPH 0181' and 'CNPH 0645' (both with yellow fruits color) as genomic templates. A single amplicon (variable in size) was obtained with the primer pair targeting the promoter region of the CCS gene using genomic DNA of all red-fruit

accessions and also in one yellow-fruit accession (*C. frutescens* ‘CNPH 2871’). The promoter amplicon size showed a species-specific association with the following pattern (1) an amplicon of 920 bp exclusively was found in *C. annuum* accessions; (2) an amplicon of 998 bp was observed only in accessions of *C. baccatum* and *C. frutescens*; and (3) an 1117 bp amplicon was observed in the majority of the *C. chinense* accessions, but also in one accession tentatively classified as *C. frutescens*. The present work showed the presence of variability in the molecular structure of the CCS promoter region across different accessions and species of *Capsicum* analysed. This information might be useful in identification systems of species/cultivars as well as in assisted selection.

1. Introdução

O continente americano, especificamente, em suas regiões tropicais, é reconhecido como o centro de origem e de diversidade do gênero *Capsicum* (REIFSCHNEIDER, 2000). Existe uma grande diversidade fenotípica em relação à coloração de fruto maduros no gênero *Capsicum*. Esta variabilidade no padrão de cores pode variar desde o branco até o vermelho intenso, passando por diferentes intensidades de amarelo, laranja, roxo e marrom. A via biossintética de carotenóides em *Capsicum* produz a maior diversidade de pigmentos conhecida em plantas cultivadas, embora a capsantina e capsorubina sejam os pigmentos principais (HA *et al.*, 2007).

Em *Capsicum*, esta variação de cor é influenciada por vários genes. A expressão do locus **b** dominante resulta na expressão de alta quantidade de β -caroteno, no entanto a interação do gene *t* com o gene **b** produz uma variação no nível de acumulação de β -caroteno (LEFEBVRE *et al.*, 1998). Em frutos maduros, o gene que evita a degradação da clorofila (*cl*), em combinação com o gene y^+ (fruto de cor vermelha) ou com o gene *y* (cor do fruto amarela), resulta na produção de fruto marrom ou verde oliva, respectivamente (SMITH, 1950). Genes inibidores de pigmentos carotenóides, como *c1* e *c2*, inibem a acumulação de carotenóides no fruto maduro (LEFEBVRE *et al.*, 1998). De modo geral, estes estudos indicam que o controle da coloração de fruto maduro é uma característica complexa envolvendo a interação de pelo menos quatro “loci” distintos: *c-1* and *c-2* (“carotene pigment inhibitors”), *cl* (“chlorophyll retainer”) e y^+ (“mature red fruit”). O gene y^+ foi caracterizado, pela primeira vez, em *C. annuum* e

corresponde ao gene codificador da enzima Capsantina-capsorubina sintase (CCS). Em alguns acessos, foi observado que uma deleção de um segmento do gene CCS resulta no fenótipo frutos maduros de coloração amarela (LEFEBVRE *et al.*, 1998). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade do gene codificador da CCS em diferentes espécies do gênero *Capsicum*.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de diferenças genéticas tanto nas regiões codificadora quanto nas regiões promotoras dos alelos do gene responsável pela síntese da enzima CCS em 24 acessos de quatro espécies do gênero *Capsicum*. Este estudo tem como objetivo identificar diferenças estruturais nestes segmentos genômicos, que possam revelar padrões genéticos-moleculares distintos (amplicons polimórficos) tanto entre acessos de diferentes colorações de fruto quanto entre espécies de *Capsicum*. Esta informação pode ser útil no estabelecimento de sistemas de seleção assistida, podendo, também, elucidar aspectos da história evolutiva do gene CCS e o impacto desta variabilidade no fenótipo cor de fruto maduro neste importante gênero da família Solanaceae.

2. Revisão de Literatura

2.1. Biologia Molecular da Via Biossintética dos Carotenóides

Os carotenóides são os pigmentos que acumulam em folhas, flores, raízes e frutos de todas as espécies vegetais, conferindo colorações amarelas, alaranjadas e avermelhadas. A função fisiológica destes compostos em tecidos verdes é a de proteger o aparato fotossintético do excesso de radiação solar (SANDMANN *et al.*, 2006). Em frutos de *Capsicum*, os carotenóides apresentam funções ecológicas, provendo os frutos com atrativas colorações que contribuem para a atração, especialmente, de pássaros que auxiliam na dispersão de sementes e estabelecimentos das plantas em novos nichos ecológicos (PARAN & KNAAP, 2007). Além destas funções, alguns carotenóides são importantes elementos nutricionais e nutracêuticos na dieta humana devido à ação de pró-vitamina A e também como antioxidantes.

Estudos sobre biossíntese de carotenóides em flores e frutos em diferentes plantas indicam uma regulação transcricional (BRAMLEY, 2002; CUNNINGHAM, 2002; DUBEY *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2004; RÖMER & FRASER, 2005; HOWITT

& POGSON 2006; CLOUTAULT *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2008). Esta regulação é bastante distinta da que ocorre em tecidos vegetativos. No caso de frutos ocorre a transformação dos cloroplastos em cromoplastos e a produção de carotenóides aumenta drasticamente (SANDMANN *et al.*, 2006). Este processo foi estudado com bastante detalhe durante a maturação dos frutos de *Capsicum* (CAMARA *et al.*, 1995). De maneira similar ao que tem sido observado em tomate, nos frutos de *Capsicum* ocorrem uma mudança qualitativa e quantitativa na composição de carotenóides, durante o amadurecimento, e todos os genes da via biossintética são expressos em maior quantidade, confirmando sua regulação transcricional (RÖMER *et al.*, 1993). Além disso, é observado a formação das xantofilas vermelhas (capsantina e capsorubina) que não são encontradas em tecidos vegetativos (CAMARA *et al.*, 1995). Estas xantofilas são produtos formados pelo processo de ciclização, hidroxilação e formação do anel κ a partir da molécula de licopeno (Figura 1).

2.2. Genética clássica e molecular do acúmulo de carotenóides em frutos de *Capsicum*

Vários mutantes que afetam a cor e o perfil de carotenóides de frutos maduros foram relatados na espécie *C. annuum*. A cor vermelha é descrita como dominante ($y+$) sobre a cor amarela (y). A presença simultânea do alelo cl (“chlorophyll retainer”) e $y+$ resultam na produção de frutos com a cor marrom ou chocolate (SMITH, 1950). Frutos maduros e verdes (chamados “permagreen”, tendo a cor amarelada ou verde-oliva) podem ser obtidos em plantas com homozigose recessiva para os dois genes ($yy/clcl$) (GREENLEAF, 1986). Estudos conduzidos em *C. annuum* por HURTADO-HERNADEZ & SMITH (1985) indicaram que o fenótipo cor de fruto se deve à presença de três genes independentes [y , $c-1$ e $c-2$]. Os genótipos e respectivos fenótipos destas combinações gênicas seriam: ($y+/c-1+/c-2+$ = vermelho); ($y+/c-1/c-2+$ = vermelho claro); ($y+/c-1/c-2$ = laranja); ($y+/c-1/c-2$ = laranja-claro); ($y/c-1+/c-2+$ = alaranjado); ($y/c-1+/c-2$ = laranja claro-amarelo); ($y/c-1/c-2+$ = amarelo-limão); e ($y/cl/c2$ = branco permanente).

Estudos adicionais utilizaram um maior número de cruzamentos: um acesso branco permanente ($yy/c-1c-1/c-2c-2$) foi cruzado, respectivamente, com plantas com frutos laranja, laranja-amarelado, amarelo-limão e marrom (SHIFRISS & PILOVSKY,

1992). A análise dos resultados mostrou que a coloração laranja é recessiva e que a coloração laranja-amarelada não é dominante sobre a coloração branca permanente. Cruzamentos de plantas de frutos laranja com plantas de frutos vermelhos resultaram em uma segregação do tipo di-híbrido com três fenótipos. Cruzamentos de amarelo-limão com branco permanente, também, resultaram em segregação do tipo di-híbrido (HURTADO-HERNADEZ & SMITH, 1985). O genótipo associado com a coloração branca permanente foi proposto como: $yy/cl+cl+$ (homozigoto para degradação prematura da clorofila). A segregação sugeriu, também, uma ligação entre $cl+$ de branco permanente mais os 'loci' recessivos $c-1$ ou $c-2$ que controlam o fenótipo branco permanente ($yy/c-1c-1/c-2c-2$). Desta forma, os genótipos mais prováveis para branco permanente seria $cl/c-1+/c2$, para verde e marrom seriam $cl/c-1/c-2+$ ou $cl/c-1+/c-2+$ (SHIFRISS & PILOVSKY, 1992). Recentemente, o gene da CCS, responsável, pela conversão da anteraxantina para capsantina e da violaxantina para capsorubina (Figura 1), foi proposto como sendo o gene candidato para o locus $y+$ (LEFEBVRE *et al.*, 1998).

Muitos dos genes codificadores de enzimas da via biossintética dos pigmentos carotenóides foram caracterizados em *Capsicum* (DOGBO & CAMARA, 1987; HUGUENEY *et al.*, 1992; KUNTZ *et al.*, 1992; RÖMER *et al.*, 1993; HUGUENEY *et al.*, 1995; BOUVIER *et al.*, 1996; HUGUENEY *et al.*, 1996). Estes genes foram investigados como potenciais marcadores funcionais para cor de fruto em *C. annuum*. O gene codificador da Capsantina-capsorubina sintase (CCS) tem sido um dos principais alvos destes estudos uma vez que esta enzima está envolvida na síntese dos principais pigmentos (capsantina e capsorubina), relacionados com a típica coloração vermelha dos frutos maduros de *Capsicum*. O gene correspondente ao locus y foi identificado como CCS e a deleção da região codante deste gene tem sido relacionada ao fenótipo cor de fruto amarela (LEFEBVRE *et al.*, 1998), bem como a região promotora do gene (HA *et al.*, 2007).

Um gene recessivo afetando a hidroxilação do carotenóide β -caroteno e a formação de β -criptoxantina foi relatado como sendo responsável pelo fenótipo fruto laranja na variedade mutante 'Orangeva Kapia' (CHALUKOVA *et al.*, 1993). Trabalhos conduzidos por HUH *et al.* (2001) analisaram vários genes da via biossintética de carotenóides (FPS, GGPS, PSY, PDS, LCY e CCS), por RFLP e AFLP em progênes de cruzamentos interespecíficos (*C. annuum* 'TF68' – de frutos vermelhos

x *C. chinense* 'Habanero-Laranja'). Neste estudo foi observado que o gene da Fitoeno-sintase co-segregou com o fenótipo cor de fruto com comportamento similar ao gene *c-2*.

2.3. Enzimas e Genes da Via Biosintética dos Carotenóides

Os genes da via biosintética de carotenóides foram introduzidos em organismos não carotenogênicos e assim a função de cada um destes genes tem sido demonstrada (SCHMIDT-DANNERT *et. al.*, 2000). Para a indução dessa via biosintética em organismos que não apresentam a habilidade de sintetizar carotenóides foi necessária a presença do gene *crtB* que codifica a enzima Geranylgeranyl difosfato sintase (GGPPS) e do gene *crtE* que codifica a enzima Fitoeno-sintase (PSY). Pela ação desses dois genes é formado, de forma irreversível, o primeiro composto carotenóide, o fitoeno (SCHMIDT-DANNERT *et. al.*, 2000). O fitoeno é um composto incolor que possui a estrutura básica C₄₀ dos carotenóides, sendo o precursor de todos os demais carotenóides.

Os genes que codificam a enzima PSY foram identificados e isolados em diversas plantas. Em tomate, foram encontrados dois genes para esta enzima, os quais foram caracterizados bioquimicamente. Observou-se que o gene *PSY-1* é específico de cromoplastos e o genes *PSY-2* é específico de cloroplastos (FRASER *et al.*, 1999). Os demais componentes da via são produzidos por processos de dessaturação do fitoeno, ativado pela ação do gene *crtI*, que dá origem ao carotenóide licopeno após várias etapas de dessaturações promovidas pelas enzimas Fitoeno dessaturase (PDS) e Zeta caroteno dessaturase (ZDS). A enzima Licopeno ciclase, codificada pelo gene *crtY*, encontra-se em um ponto de ramificação e determina o ponto na via onde ocorre a ciclização dos carotenóides (ISAACSON *et. al.*, 2002). Os passos seguintes ocorrem através da ação de hidroxilase, epoxidase e ketolase, formando um grande repertório de moléculas do tipo xantofilas (BRITTON, 1995).

O isolamento de alguns genes da via biosintética de carotenóides possibilitou intensificar a acumulação de alguns carotenóides em culturas de interesse nutricional, de forma a suplementar a dieta humana (YE *et al.*, 2000). No entanto, apesar do vasto conhecimento da via biosintética de carotenóides, a produção de plantas transgênicas e mutantes, têm, geralmente, provocando efeitos fisiológicos, moleculares e bioquímicos

inexplicáveis e, muitas vezes, deletérios, demonstrando a necessidade de mais estudos em relação aos mecanismos regulatórios desta via (ROMER & FRASER, 2005). Na expressão constitutiva do gene codificador da enzima PSY em tomateiro, FRAY *et al.* (1995) obtiveram maior nível de licopeno em frutos jovens, quando comparado aos maduros. No entanto, também foi verificado que as folhas jovens apresentaram baixo conteúdo de clorofila, já que a maior produção de licopeno demandou uma maior quantidade de GGPP, diminuindo assim esse composto, que é o precursor de giberelina e da cadeia de fitol da clorofila (Figura 1). Este problema foi resolvido posteriormente por FRASER *et al.* (2002) através da expressão de um homólogo de PSY de bactéria, diretamente, no cloroplasto, com aumento nos níveis de licopeno e β -caroteno.

Nas plantas, os genes responsáveis pela síntese de pigmentos carotenóides estão localizados no genoma nuclear e as proteínas sintetizadas são transportadas como pré-proteínas para os plastídeos, onde são processadas. Como o local de síntese dos carotenóides ocorre nos plastídeos e as enzimas envolvidas nesse processo são codificadas no núcleo, o destino destas enzimas depende de proteínas especializadas (INOUE, 2004). Algumas enzimas da via biossintética dos carotenóides, tais como a Isopentenil pirofosfato isomerase (IPI), a Geranylgeranyl difosfato sintase (GGPPS) e a Fitoeno-sintase (PSY) estão agregadas como um complexo mutienzimático no estroma dos plástídeos. Outro grupo de enzimas tais como a Fitoeno dessaturase (PDS), Zeta caroteno dessaturase (ZDS), Licopeno beta-ciclase (LCYB) e Licopeno epsilon-ciclase (LCYE) está associado com a membrana dos tilacóides (CUNNINGHAM & GANTT, 1998).

2.4. A Via Biosintética dos Carotenóides em *Capsicum*

O isopentenil difosfato (IPP) é o precursor dos carotenóides e dos demais terpenóides. A síntese do IPP utilizado na via biossintética dos carotenóides pode ser realizada no citosol, a partir da via do ácido mevalônico (MVA) ou nos plastídeos, pela condensação de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato (CUNNINGHAM & GANTT, 1998, RASID *et al.*, 2009). A biossíntese de carotenóides a partir de IPP envolve seis etapas: (1) formação do ácido mevalônico; (2) formação do geranylgeranyl difosfato; (3) formação do fitoeno e (4) dessaturação; (5) ciclização e (6) hidroxilação resultando na síntese de xantofilas (GROSS, 1991).

O IPP é primeiro isomerizado a dimetialildifosfato (DMAPP) e, pela adição de uma molécula de IPP, forma um composto de 10 carbonos, o geranyl difosfato (GPP). Adições sucessivas de IPP dão origem a moléculas de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP) e de 20 carbonos, o geranylgeranildifosfato (GGPP) (GROSS, 1991). A formação do primeiro composto carotenóide, o fitoeno, é sintetizado através de uma reação de condensação de duas moléculas de 20 carbonos de GGPP, catalizada pela enzima Fitoeno-sintase. As etapas posteriores envolvem a dessaturações sucessivas do fitoeno e produção do zeta-caroteno, neurosporeno e, ao final, o licopeno. A partir do licopeno ocorre uma ramificação da via biossintética e a rota a seguir, vai depender da enzima presente. O licopeno pode ser convertido em β -caroteno ou α -caroteno de acordo com a atuação das enzimas Licopeno beta-ciclase e/ou Licopeno zeta-ciclase. Neste ponto, também ocorre o processo de ciclização dos carotenóides. A hidroxilação dos anéis terminais desses últimos carotenóides resulta na produção das xantofilas (carotenóides oxigenados): a luteína e a α -criptoxantina (a partir de α -caroteno) e os carotenóides β -criptoxantina, zeaxantina, antheraxantina, violaxantina e neoxantina (a partir de β -caroteno) (ISAACSON *et al.*, 2002).

As espécies de *Capsicum* são caracterizadas por apresentarem uma via de biossíntese de carotenóides mais longa que de outras solanáceas tais como o tomateiro. O último passo da via biossintética de carotenóides é a conversão de antheraxantina em capsantina e violaxantina em capsorubina, reação catalisada pela enzima Capsantina-capsorubina-sintase (CCS). A capsantina e a capsorubina (pigmentos reportados exclusivamente em *Capsicum*) são responsáveis pela coloração vermelha típica dos frutos maduros desse gênero (DELI *et al.*, 2001). Essas xantofilas não acumulam em tecidos clorofilados, mas são unicamente sintetizadas durante o processo de amadurecimento dos frutos (MÍNGUEZ-MOSQUERA & HONERO-MENDEZ, 1994). Estes pigmentos são classificados como ketocarotenóides (CUNNINGHAM & GANTT, 1998).

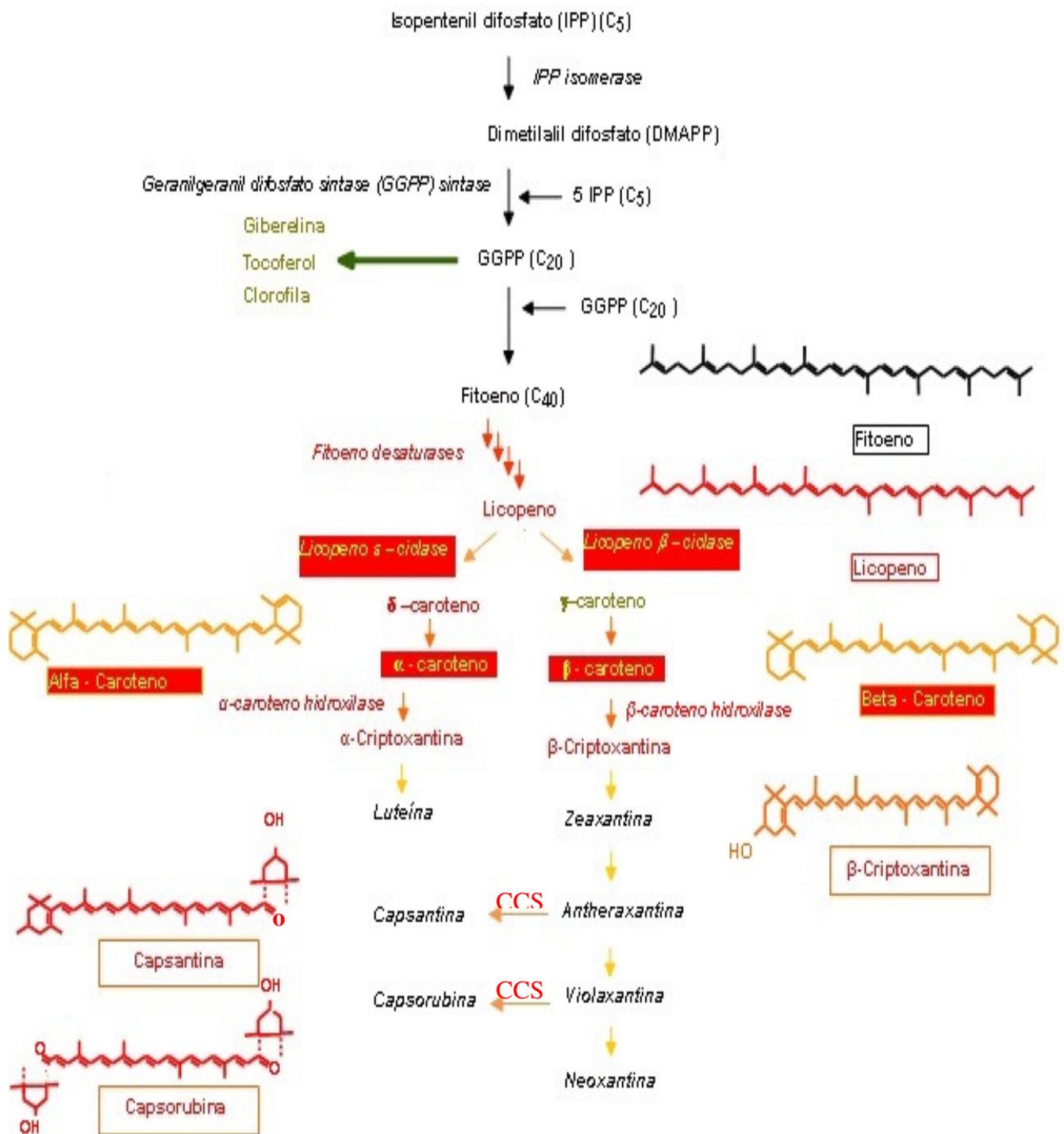


Figura 1. Esquema da via Biossintética dos carotenóides em *Capsicum*

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a diversidade estrutural de alelos do gene que codifica a enzima CCS visando o desenvolvimento de marcadores moleculares passíveis de serem utilizados na seleção precoce do fenótipo cor de frutos no gênero *Capsicum*. Esses marcadores moleculares poderão ser utilizados na taxonomia do gênero e também como uma ferramenta para a seleção assistida em programas de melhoramento genético de *Capsicum*.

3.2. Objetivo Específico

Isolar via PCR heterólogo e caracterizar via sequenciamento a diversidade de alelos de uma coleção de materiais genéticos, incluindo linhagens de quatro espécies do gênero *Capsicum*, quanto à estrutura do gene codificador da CCS (região codante e região promotora do gene).

4. Material & Métodos

4.1. Acessos de espécies de *Capsicum*

O trabalho foi realizado, no período de Dezembro de 2008 a Novembro de 2009 na Embrapa Hortaliças, utilizando 24 acessos de *Capsicum* de quatro espécies domesticadas, *C. annuum* L., *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*. As plantas foram semeadas em bandejas de isopor de 72 células. Após 30 dias foram transplantadas para vasos de 5 litros e mantidas em casa de vegetação. Quando as plantas estavam com 20 cm de altura foram retirada as folhas mais jovens de cada acesso para extração de DNA.

4.2. Extração de DNA

A extração de DNA das espécies de *Capsicum* foi realizada pelo método CTAB. Foram maceradas 2 g de folhas em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para

um microtubo contendo 600 µL de tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) [2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)] aquecido a 65° C em banho-maria por dez minutos, ficando em seguida à temperatura ambiente por cinco minutos. Adicionou-se ao microtubo 600 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 v/v), procedendo-se à agitação num vortex e posterior centrifugação a 12.000 rpm por cinco minutos. Um total de 550 µL do sobrenadante foi coletada e o DNA foi precipitado pela adição de 300 µL de isopropanol gelado. A mistura foi submetida a uma leve agitação e posterior centrifugação (12.000 rpm por 13 minutos). Após este passo, o sobrenadante foi descartado e o DNA aderido ao fundo do tubo foi lavado com etanol 70% para remoção dos resíduos de isopropanol e de sais. Os microtubos foram colocados por 10 minutos em estufa a 37°C. O DNA foi ressuspensado em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incubado por 24 horas a 4°C. A concentração e a qualidade do DNA purificado foram estimadas em gel de agarose 1% (p/v) mediante comparação com um padrão de concentração contendo 10 ng/µL de DNA do fago lambda. Após a verificação da integridade do DNA, procedeu-se a quantificação e o ajuste da concentração de DNA das amostras de forma a padronizá-las. Todos os materiais foram diluídos para a concentração final de 20 ng/µL em Tris 0,01M.

4.3. Amplificação da região codante e promotora do gene codificador da CCS

Foram utilizados pares de iniciadores de síntese ('primers') para a amplificação específica de segmentos do gene codificador da CCS. Os códigos usados para os iniciadores e suas respectivas sequências foram: **PAL 1D**: 5'-CCT TTT CCA TCT CCT TTA CTT TCC ATT-3'; **PAL 7R**: 5'-AAG GCT CTC TAT TGC TAG ATT GCC CAG-3'; (LEFEBVRE *et al.*, 1998) e **CCS promo1 FOR**: 5'-CCC CCT TCG GTT AGT TTG TGT-3'; **CCS promo1 REV**: 5'ATG GCT ATT TAT GAG AGG AGG TGA-3' (desenhados durante o presente trabalho).

A PCR foi realizada nos termocicladores PCR System 9700 (Applied Biosystems Co.). Para cada reação utilizou-se a seguinte concentração de cada reagente para um volume final de 12 µL: MgCl₂ 2,0 mM, iniciadores de síntese (0,2 mM cada) e Taq DNA Polymerase High Fidelity® (HiFi) 1U. Todos os reagentes empregados para PCR foram da Invitrogen LifeTechnologies. A PCR constituiu-se de um ciclo inicial de

desnaturação a 94° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos repetidos com as temperaturas de 96° C por 30 segundos, 53° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos, finalizando-se com um ciclo extra de extensão a 72° C por 10 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etidium, 5 µg/mL em água.

4.4. Sequenciamento da região codante e promotora do gene da Capsantina capsorubina sintase

Foi realizado o sequenciamento direto dos produtos da PCR em um sequenciador ABI 3100, utilizando o kit ABI Prism BigDye version 3.0 (Applied Biosystems). Os iniciadores de síntese senso e anti-senso, para cada gene, foram utilizados, individualmente, na reação de sequenciamento de cada amostra a fim de obter, por meio do consenso, um fragmento de maior tamanho possível. Para cada reação foram utilizados 40 ng de DNA quantificado em gel de agarose e 5 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese. As sequências correspondentes ao fragmento gênico de cada uma das espécies estudadas foram obtidas a partir do consenso dos fragmentos sequenciados com os iniciadores senso e anti senso utilizando-se o programa SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, WI, EUA). As sequências obtidas para os genes codificadores da enzima CCS e da região do promotor deste gene foram submetidas ao banco de dados do GenBank pelo programa BLASTn, na página eletrônica do National Center for Biotechnology Information – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. Resultados & Discussão

O amplicon resultante da região codante se mostrou monomórfico (tamanho similar em todos os materiais avaliados). Esta região não foi amplificada nos acessos amarelos da espécie *C. annuum* ('CNPH 0181' e 'CNPH 0645', Figura 2). No entanto, a mesma região foi amplificada com sucesso e sequenciada em acessos de frutos amarelos da espécie *C. chinense* ('CNPH 0434', 'CNPH 0578', 'CNPH 2836', 'CNPH 2850' e 'CNPH 2852'). O amplicon foi analisado via sequenciamento direto buscando diferenças internas dentre os acessos. No entanto, não foram encontrados polimorfismos ligados à cor de fruto. A figura 3 mostra parte do alinhamento da região codante e

alguns polimorfismos de bases. A correlação entre a deleção do gene da CCS e cor de fruto amarela foi estabelecida, inicialmente, na espécie *C. annuum* (LEFEVBRE *et al.*, 1999) e contestada, posteriormente, em estudos feitos com acessos de frutos amarelos da espécie *C. chinense* (HA *et al.*, 2007). No presente trabalho esta informação foi confirmada nos acessos das duas espécies e a análise foi expandida para incluindo dois acessos de *Capsicum frutescens*.

A região do promotor não foi amplificada a partir de DNA genômico extraído dos acessos *C. annuum* ‘CNPB 0181’ e ‘CNPB 0645’ (ambos de coloração amarela). Um único amplicon (de tamanho variável) foi detectado nos demais acessos de coloração vermelha e em um acesso de coloração amarela (*C. frutescens* ‘CNPB 2871’). O sequenciamento parcial de um dos amplicons comprovou a identidade deste segmento com a região promotora do gene da CCS. O tamanho do amplicon apresentou uma associação espécie-específica estando relacionados da seguinte forma: (1) um amplicon de 920 bp foi observado, exclusivamente, em acessos de *C. annuum*; (2) um amplicon de 998bp foi observado apenas em acessos de *C. baccatum* e *C. frutescens*; (3) um amplicon de 1117 bp foi observado na maioria dos acessos de *C. chinense* e em um acesso classificado como *C. frutescens*.

Desta forma, este trabalho revela que a correlação entre a deleção da região codante do gene CCS e a cor de fruto amarela não pode ser generalizada para todo o gênero *Capsicum*. Além disso, as diferenças estruturais (deleções e inserções de vários tamanhos) na região do promotor do gene CCS ocorrem de forma espécie-específica. Esta informação poderá ser útil em sistemas de identificação de espécies/cultivares bem como em seleção assistida.

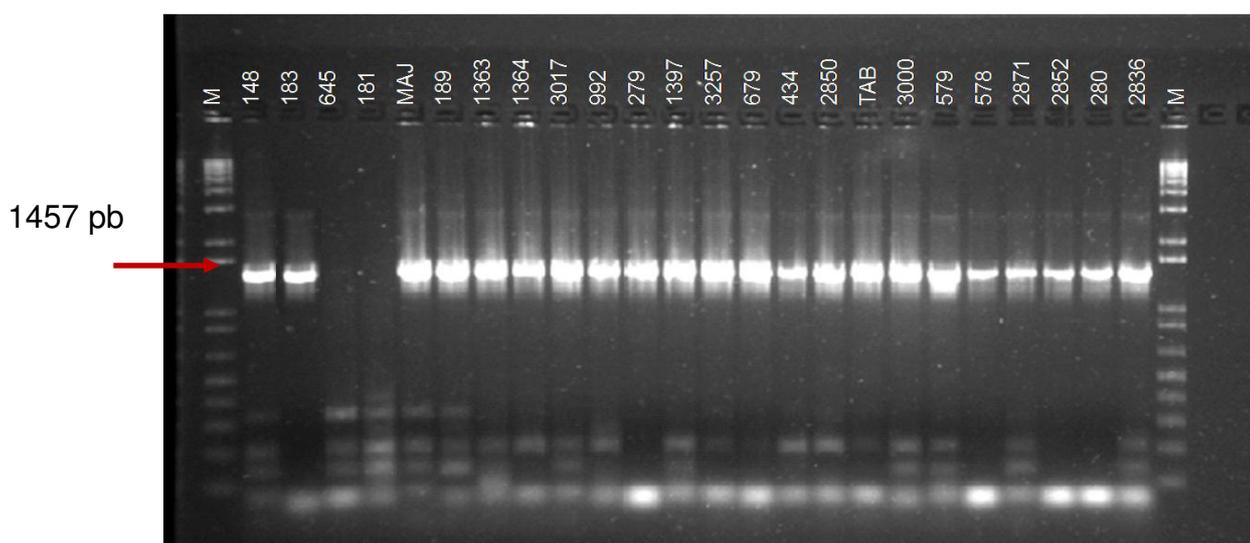


Figura 2. Amplicons obtidos após amplificação com os “primers” PAL 1D e PAL 1R, específicos para a região codante do gene CCS, visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os acessos ‘CNPH 3017’, ‘CNPH 0992’, ‘CNPH 0279’ e ‘CNPH 2836’ apresentam frutos de cor alaranjada. Os acessos ‘CNPH 0645’ e ‘CNPH 0181’ apresentam frutos amarelos. O acesso ‘CNPH 0679’ apresenta frutos marrons e os acessos ‘CNPH 0578’ e ‘CNPH 2852’ apresentam frutos brancos. Os demais acessos apresentam frutos vermelhos.

```

190      200      210      220      230      240      250      260      270      280
0578 CC B TTCCATTCTAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 154
0434 CC V TTCCGTTCTTAAAACAAAAGCAGTGCACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTATCTCCCTCTCAAAGCCGGAGTCTTACATATGAACATGGCAAGGTTG 132
2836 CC A TTCCGTTCTAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTATACCACACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 151
2850 CC V TTCCATTCTATAAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGACCCACCTGAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAACTGCTCATGGGTTG 114
2852 CC B TTCCATTCTAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATATCATGGGTTG 180
0679 CC V TTCCATTCTAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATATCATGGGTTG 152
2871 CF A CTT--TTTCGGAAACAAAATCGGT-TGGGTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGACCCACCTCAAAGCCGGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 166
3257 CF V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 146
Taba CF V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 174
0579 CF V TTTTATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 161
GenB CA V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 286
0148 CA V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACCTCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCAAAGGTTG 141
0189 CA V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 174
0183 CA V TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 180
0279 CB L TTCCATTATAGAAACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 173
1363 CB V TTTTATTATAGATACAAAAGCAGTACACATTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTAAACATCTCATGGGTTG 126

290      300      310      320      330      340      350      360      370      380
0578 CC B ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 253
0434 CC V ATATTGATCGCC-TAAGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 231
2836 CC A ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 250
2850 CC V ATTTGATGCTT-TACGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 213
2852 CC B ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 279
0679 CC V ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 251
2871 CF A ATACTGATCTCT-TAAGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 265
3257 CF V ATACTGATCTGG-TACGGGCTGAATTCGATGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 248
Taba CF V ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGATGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 273
0579 CF V ATACTGATCTGGT-ACCGGGCTAAATTCGATGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 261
GenB CA V ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 385
0189 CA V ATACTGATCTCT-TACGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 240
0148 CA V ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 273
0183 CA V ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 279
0279 CB L ATACTGATCTGG-ACCGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 272
1363 CB V ATACTGATCTGG-TAAGGGCTGAATTCGACGTGATCATCATTTGGAACTGGCCCTGCCGGGCTTCGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGAAATTAAAG 225

390      400      410      420      430      440      450      460      470      480
0578 CC B TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 353
0434 CC V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 331
2836 CC A TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 350
2850 CC V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 313
2852 CC B TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 379
0679 CC V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 351
2871 CF A TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 365
3257 CF V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 345
Taba CF V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 373
0579 CF V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 361
GenB CA V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 485
0189 CA V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 340
0148 CA V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 373
0183 CA V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 379
0279 CB L TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 372
1363 CB V TATGTTGCGTTGACCCCTCACCACCTTTCCATGTGGCCAAATAAATTATGGTGTGTTGGGTTGATGATTTGAAAAGTTGGGATTAGAAGATTGTCTAGATCA 325

```

Figura 3. Fragmento do alinhamento correspondente a região codante do gene da Capsanthin/capsorubin synthase pelo método Clustal (Megalign-Lasergene, Madison, WI). Os polimorfismos observados em comparação com a sequência depositada no GenBank são mostrados em amarelo. As 16 sequências comparadas são identificadas com o número da coleção do CNPH, código da espécie: CC = *Capsicum* chinense, CF=*Capsicum* frutescens, CA=*Capsicum* annum, CB = *Capsicum* baccatum, Taba = *Capsicum* frutescens ‘Tabasco’, GenB=GenBank X76165. E os códigos da cor do fruto foram: A = amarelo, V = vermelho, L = laranja. O polimorfismo apresentado na posição 378 (numeração da sequência GenB) pode representar uma mutação específica das espécies CA e CB. Esta mutação silenciosa que não altera a proteína (GGT ou GGA são códigos do aminoácido Glicina).

6. Referências Bibliográficas

BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; HUGUENEY, P.; MARIN, E.; MARION- POLL, A.; CAMARA, B. Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of a-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p.28861-28867, 1996.

BRAMLEY, P. M. Is lycopene beneficial to human health? **Phytochemistry**, v. 54, n.3, p.233-236, 2002.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The Faseb Journal**, v. 9, p.1551-1558, 1995.

CAMARA, B.; HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; KUNTZ, M.; MON'EGER, R. Biochemistry and molecular biology of chromoplast development. **International Review of Cytology**, v. 163, p.175-247, 1995.

CHALUKOVA, M.; DASKALOV, S.; LUKARSKA, E.; BARALIEVA, D. Beta-orange mutant in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 12, p.57-58, 1993.

CLOTAULT, J.; PELTIER, P.; BERRUYER, R.; THOMAS, M.; BRIARD, M.; GEOFFRIAU, E. Expression of carotenoids genes during carrot root development. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 13, p. 3563-3573, 2008.

CUNNINGHAM , F. X.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p.557-583, 1998.

CUNNINGHAM , F. X. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.8, p.1409-1417, 2002.

DELI, J.; MOLNAR, P.; MATUS, Z.; TOTH, G. Carotenoid composition in the fruits of the red paprika (*Capsicum annum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; Biosynthesis of carotenoids in paprika. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1517-1523, 2001.

DOGBO, O.; CAMARA, B. Purification of Isopentenyl pyrophosphate isomerase and Geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annum* chromoplasts by affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 920, p.140–148, 1987.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, p.637-646, 2003.

FRASER, P. D.; KIANO, J. W.; TRUESDALE, M. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 687–698, 1999.

FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KIANO, J. W.; MISAWA, N.; DRAKE, R. G.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional Phytoene synthase in a fruit-specific manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n.2, p.1092-1097, 2002.

FRAY, R. G.; WALLACE, A.; FRASER, P. D.; VALERO, D.; HEDDEN, P.; BRAMLEY, P. M.; GRIERSON, D. Constitutive expression of a fruit Phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. **The Plant Journal**, v. 8, n.5, p.693–701, 1995.

GREENLEAF, W. H. Pepper breeding *In*: Bassett, M. J. ed. **Breeding Vegetable Crops**. Connecticut: AVI Publishing Co. Westport. 1986, p.67-134.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. London: Chapman and Hall, 1991, 351p.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p.333–342, 2002.

KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M.; Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. **Plant Physiology**, v.134, p.824-837, 2004.

KUNTZ, M.; ROMER, S.; SUIRE, C.; HUGUENEY, P.; WEIL, J. H.; SCHANTZ, R.; CAMARA, B. Identification of a cDNA for the plastid-located Geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. **The Plant Journal**, v.2, p. 25-34, 1992.

HA, S. H.; KIM, J. B.; PARK, J. S.; LEE, S. W. E.; CHO, K. J. A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the Capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.3135- 3144, 2007.

HUH, J. H.; KANG, B. C.; NAHM, S. H.; KIM, S.; HA, K. S.; LEE, M. H.; KIM, B. D. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.).**Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p.524–530, 2001.

HUGUENEY, P.; RÖMER, S.; KUNTZ, M.; CAMARA, B. Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and β -carotene in *Capsicum* chromoplasts. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.399–407, 1992.

HUGUENEY, P.; BADILLO, A.; CHEN, H. C.; KLEIN, A.; HIRSCHBERG, J.; CAMARA, B.; KUNTZ, M. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. **The Plant Journal**, v.8, p.417-424, 1995.

HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; BADILLO, A.; QUENNEMET, J.; D'HARLINGUE, A.; CAMARA, B. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. **Plant Physiology**, v.111, n.619-626, 1996.

HOWITT, C. A.; POGSON, B. J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. **Plant, Cell and Environment**, v.29, p.435-445, 2006.

HURTADO-HERNADEZ, H.; SMITH, P.G. Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. **Journal of Heredity**, v.76, p.211-213, 1985.

INOUE, K. Carotenoid hydroxylation – P450 finally!. **Trends in Plant Science**, v.9, n.11, p.515-517, 2004.

LEFEBVRE, V; KUNTZ, M; CAMARA, B; PALLOIX, A. The Capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p.785-789, 1998.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MENDEZ, D. Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p.38-44, 1994.

PARAN, I; KNAAP, E, v. D. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.3841-3852, 2007.

RASID, O. A.; PARVEEZ, G. K. A.; HO, C. L.; RAVIGADEVI, S.; NAPIS, S. Plant carotenoids: molecular genetics and regulation. **Journal of Oil Palm Research**, v.21, p.588-601, 2009.

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

ROMER, S.; FRASER, P. D. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. **Planta**, v. 221, p.305-308, 2005.

ROMER, S.; HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; CAMARA, B.; KUNTZ, M. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v.196, p.1414-1421, 1993.

SANDMANN, G.; RÖMER, S.; FRASER, P. D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. **Metabolic Engineering**, v.8, p.291-302, 2006.

SCHMIDT-DANNERT, C.; UMENO, D.; ARNOLD, F. H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. **Nature Biotechnology**, v.18, p.750-753. 2000.

SHIFRISS, C.; PILOVSKY, M. Studies of the inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. **Euphytica**, v.60, p.123-126, 1992.

SMITH, P. G. Inheritance of brown and green mature color in peppers. **Journal of Heredity**, v. 41, p. 138-140. 1950.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHYIMA, A. Biosynthesis of plants pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p.733-749, 2008.

YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A; ZHANG, J; LUCCA, P; BEYER, P; POTRYKUS, I. Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, v. 287, p. 303-305, 2000.