

ACÁCIO RODRIGUES SALVADOR

**ASPECTOS METABÓLICOS EM FRUTOS DE ACESSOS
CONTRASTANTES DE *Capsicum chinense* AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S182a
2015 Salvador, Acácio Rodrigues, 1991-
Aspectos metabólicos em frutos de acessos
contrastantes de *Capsicum chinense* ao longo do
desenvolvimento / Acácio Rodrigues Salvador. - Viçosa, MG,
2015.

viii, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador : Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.28-34.

1. Pimenta. 2. Capsaicinóides. 3. Metabolismo
secundário. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 635.6432

ACÁCIO RODRIGUES SALVADOR

**ASPECTOS METABÓLICOS EM FRUTOS DE ACESSOS
CONTRASTANTES DE *Capsicum chinense* AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADO: 17 de julho de 2015.

Wagner L. Araújo

Agustin Zsögön

Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

“Acredite em si próprio e chegará um dia em que os outros não terão outra escolha senão acreditar com você.”

Cynthia Kersey

Dedico este trabalho aos meus pais, Amorim e Maria,
aos meus irmãos, Amorim Junior e Marcelo,
à minha Família e aos eternos Amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meus pais pelo apoio e pela motivação que me fizeram chegar até aqui;

O professor Adriano, amigo e excepcional orientador, pelas grandes oportunidades oferecidas a mim e por confiar no meu trabalho;

À minha namorada Josicelli por me mostrar que o amor fortifica;

Aos meus grandes amigos de longa data, Thiago e Roberto, pelo companheirismo e momentos de alegria;

Aos professores Wagner Araújo, Marcelo Rogalski, Fábio DaMatta, Dimas Ribeiro e Agustin Zsogon pelos conselhos profissionais e amizade;

Ao Jorge Perez, Willian Batista, Jonas Vargas, Monalessa e Paulo Menezes pelo companheirismo profissional e amizade;

À todos os colegas de laboratórios, em especial a família UCP pelo companheirismo e alegria até mesmo em momentos de trabalho;

À secretária Luciene pela ótima recepção, atenção e carisma;

À todos técnicos de laboratório pela ajuda;

Aos meus amigos que estão distantes, mas que ao mesmo tempo estão por perto me dando força;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu conhecimento e com a conclusão deste trabalho;

Ao CNPQ, FAPEMIG e Max-Planck-Institut pelo apoio durante o decorrer do projeto;

À todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	viii
2 MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 Material vegetal e condições experimentais.....	5
2.2 Determinação da pungência.....	6
2.3 Determinação de metabólitos primários	6
2.4 Teor de sólidos solúveis totais (TSS)	6
2.5 Determinação de pigmentos	7
2.6 Determinação de fenóis solúveis totais	7
2.7 Parâmetros biométricos	7
2.8 Determinação de metabólitos secundários	7
2.9 Delineamento experimental e análises estatísticas	8
3 RESULTADOS	8
3.1 Variabilidade e desenvolvimento de frutos	8
3.2 Determinação de Capsaicinóides e Brix° ao longo do desenvolvimento de frutos de diferentes acessos de C.chinense.....	9
3.3 Variações nos níveis de metabólitos primários e secundários ao longo do desenvolvimento de frutos de acessos de C. chinense.....	11
3.4 Correlações observadas entre os metabólitos avaliados nos três estádios de desenvolvimento.....	18
3.5 Análises multivariadas.....	21
4 DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÕES	27
6 REFERÊNCIAS	28
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	35

RESUMO

SALVADOR, Acácio Rodrigues. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Aspectos metabólicos em frutos de acessos contrastantes de *Capsicum chinense* ao longo do desenvolvimento.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

O gênero *Capsicum* compreende um grupo altamente diversificado de pimentas doces e picantes. Curiosamente, os frutos de *C. chinense* têm uma enorme variabilidade em termos de tamanho, forma, cor e composição química. Além da típica característica de pungência dos frutos desse gênero, resultado da presença dos capsaicinóides, os frutos de *C. chinense* também são reconhecidos como excelentes fontes de carotenóides, ácido ascórbico, tocoferóis e flavonóides. Apesar do grande potencial para uso em programas de melhoramento genético e biotecnológicos, ainda são escassos os estudos relacionando rotas metabólicas para se entender as interações responsáveis por determinados fenótipos. Assim objetivou-se identificar características metabólicas relacionadas com os teores de capsaicinóides e sólidos solúveis em frutos de *Capsicum chinense* em diferentes estádios de desenvolvimento (20, 45 e 60 dias após a antese-DAA), cultivadas em condições semicontroladas. Observou-se que os teores totais de aminoácidos, proteínas e fenóis solúveis não alteraram durante o desenvolvimento dos frutos. Por outro lado, os níveis de clorofilas, sacarose, ácidos orgânicos e amido tiveram um decréscimo ao fim dos 60 DAA. Glicose, frutose, e carotenóides aumentaram ao longo do desenvolvimento. Os acessos Ac1, A101, A54, A26 e A100 apresentaram altos teores de capsaicinóides, e os acessos Ac2, A06, A17, A18 e A83 apresentaram reduzidos teores de capsaicinóides, sendo em alguns casos não detectáveis. Os teores de sólidos solúveis tenderam a aumentar ao longo do desenvolvimento correlacionando-se negativamente com os teores de malato. Porém os metabólitos secundários, em geral, não apresentaram um padrão entre os acessos ao longo do desenvolvimento. Observaram-se correlações negativas entre capsaicinóides e aminoácidos totais e malato. Em adição, correlações entre percentual de matéria seca e níveis de malato, fumarato e capsaicinóides foram encontradas. Análise de agrupamento sugere os teores de capsaicinóides como responsáveis pela separação dos grupos. Uma vez que as demais variáveis apresentaram padrões muito diferentes entre os acessos, sugere-se alta diversidade genotípica entre os acessos estudados. Em suma, os resultados obtidos indicam que: (i) o metabolismo de glicose, frutose e sacarose em frutos de pimenta é semelhante ao que ocorre em frutos de tomate, que são climatéricos; (ii) malato e fumarato são metabólitos importantes para o desenvolvimento de frutos de *C. chinense*; (iii) malato,

flavonóides, ácidos fenólicos e outros metabólitos secundários aparentemente influenciam os teores de capsaicinóides, sólidos solúveis e percentual de matéria seca de frutos de *C. chinense*.

ABSTRACT

SALVADOR, Acácio Rodrigues. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2015. **Metabolic aspects of fruits from contrasting *Capsicum chinense* accessions throughout development.** Advisor: Adriano Nunes Nesi.

The genus *Capsicum* comprises a highly diverse group of sweet and spicy peppers. Interestingly, *Capsicum chinense* fruit have enormous variation in size, shape, color and chemical composition. Besides the typical characteristic of pungency of the fruits of this species, as a result of the presence of capsaicinoids, *C. chinense* fruits are also recognized as excellent sources of carotenoids, ascorbic acid, tocopherols and flavonoids. Despite the great potential for use in genetic and biotechnological breeding programs, there are only few studies linking metabolic pathways and the understanding of the interactions responsible for certain phenotypes have been performed. Thus the aim of this work was to identify metabolic traits related capsaicinoids and soluble solids content in fruits of *C. chinense* in different stages of development (20, 45 and 60 days after anthesis-DAA), grown in partially controlled conditions. It was observed that the total concentration of amino acids, soluble proteins and phenols did not change during fruit development. Moreover, chlorophyll, sucrose, organic acids and starch showed a decrease at 60 DAA and glucose, fructose, and carotenoids increased during the development. The Ac1, A101, A54, A26 and A100 accessions showed high levels of capsaicinoids, and the Ac2, A06, A17, A18 and A83 accessions showed reduced levels of capsaicinoids, which were in some cases undetectable. The soluble solids content tended to increase throughout the fruit development and negatively correlated with malate levels. The secondary metabolites evaluated in this study, in general did not show a pattern between accesses throughout the fruit development. Interestingly, negative correlations between capsaicinoids and total amino acids and malate were observed. In addition, correlations between the percentage of fruit dry weight, malate, fumarate and capsaicinoids levels were also evident. Cluster analysis suggests that capsaicinoids content was important for accession group separation. Since the other displayed different patterns between accesses, it is suggested that high phenotypic diversity among the accessions. In summary, the results indicated that: (i) the levels of glucose, fructose and sucrose in *C. chinense* fruits is similar to those observed in tomato fruits which has a climacteric fruit; (ii) malate and fumarate levels are important for *C. chinense* fruits development; (iii) malate, flavonoids, phenolic acids and other secondary metabolites apparently are related to capsaicinoids, soluble solids levels and percentage of dry matter in fruits of *C. chinense*.

1 INTRODUÇÃO

As espécies de pimentas do gênero *Capsicum* são membros da família Solanaceae, juntamente com outras importantes culturas como tomate e batata. Esse gênero compreende um grupo altamente diversificado de pimentas doces e picantes, compreendendo 27 espécies descritas até o momento (González-Pérez et al., 2014). Diferentemente do tomate, as pimentas são consideradas como não climatéricas, o qual apresenta padrão de amadurecimento diferenciado. O continente americano é considerado como centro de origem dessas espécies, mais especificamente as regiões tropicais e subtropicais do continente (Reifschneider, 2000). Entre as várias espécies do gênero *Capsicum*, *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* são comercialmente cultivadas (Rodriguez et al., 1999; Onus & Pickersgill, 2004; Ince et al., 2009; González-Pérez et al., 2014). No Brasil, *C. baccatum* e *C. chinense* são as mais cultivadas, uma vez que são bem adaptadas às condições de clima equatorial e tropical e possuem sabores únicos para o consumo in natura (Lannes et al., 2007b). O norte do Brasil, mais especificamente a região Amazônica, tem sido sugerido como centro de diversidade da espécie *C. chinense* (Pickersgill, 1971). No entanto, devido à grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de solos e climas, essa espécie pode ser cultivada do sul ao norte do Brasil (Lannes et al., 2007b).

Frutos da espécie *C. chinense* são utilizados como alimento fresco ou cozidos, condimento ou tempero assim como agente de coloração na indústria alimentar. Nota-se também que os frutos de *C. chinense* possuem uma enorme variabilidade em termos de tamanho, forma, cor e composição química (Lannes et al., 2007b; Wahyuni et al., 2013b), sendo assim muito utilizados como modelos para estudos de metabólitos secundários (Martinez-Lopez et al., 2014). Ressalte-se ainda que os frutos desta espécie, bem como os de outras pimentas (*Capsicum* spp.), são também conhecidos pela sua capacidade de provocar uma intensa sensação organoléptica de calor quando consumidos (Stewart et al., 2005b; Aza-Gonzalez et al., 2011). Essa característica se deve a capsaicina e seus análogos, chamados coletivamente de capsaicinóides, que constituem o princípio pungente, exclusivo para o gênero *Capsicum* (Simões et al., 2004; Paran & van der Knaap, 2007; Aza-Gonzalez et al., 2011; Qin et al., 2014). A pungência de pimentas, em uma visão ecológica, já foi descrita como importante para controlar a produção e dispersão de sementes e reduzir as infecções por fungos (Tewksbury & Nabhan, 2001; Haak et al.,

2011). Os capsaicinóides são caracterizados por capsaicina e dihidrocapsaicina, juntos representam 90% dos capsaicinóides totais (Finger et al., 2010; Wahyuni et al., 2013a). Estes compostos são sintetizados pela enzima capsaicina sintase CS (Pun1- AT3), através da condensação da vanililamina, da rota dos fenilpropanóides, com ácidos graxos de cadeia ramificada (Bennett & Kirby, 1968; Leete & Loudon, 1968; Wahyuni et al., 2013a; Kim et al., 2014) (Figura 1). Analisando a expressão gênica em pimentas picantes e doces, foi observado que aquelas não pungentes possuem uma deleção no primeiro éxon do promotor do gene AT3 que codifica para CS (Stewart et al., 2005a; Kim et al., 2014). Em adição, dados de RNA-seq sugerem que durante o desenvolvimento de frutos todos os genes que codificam enzimas da rota de biossíntese de capsaicinóides exceto o AT3, possuem padrão de expressão semelhante, enquanto que em pimentas picantes o gene AT3 é altamente expresso, ao contrário em pimentas não picantes essa expressão é inexistente (Kim et al., 2014). Entretanto, foi demonstrado também que a expressão do gene AT3 é reduzida drasticamente aos 50 DAA (Stewart et al., 2007). Além disso, a redução do acúmulo de capsaicinóides aos 45DAA é acompanhada por um aumento drástico na atividade de peroxidases especificamente na placenta, as quais são consideradas as possíveis responsáveis pela degradação dos capsaicinóides (Bernal & Barceló, 1996; Contreras-Padilla & Yahia, 1998). Assim, a pungência dos frutos de *C. chinense* é regulada não apenas pela atividade de enzimas, mas também pela expressão dos genes relacionados com a biossíntese de capsaicina. Além dessas regulações, interações metabólicas de rotas compartilhadas influenciando nos teores de capsaicinóides são também observadas (Mazourek et al., 2009).

Capsaicinóides são sintetizados exclusivamente em células epidérmicas da placenta e do citoplasma, sendo assim exportados e armazenados em “vesículas” (Figura 1). Entretanto, o mecanismo de secreção desses metabólitos secundários para o apoplasto não foi completamente esclarecido (Mazourek et al., 2009). Segundo Broderick and Cooke (2007), uma vez fora da célula os capsaicinóides são transportados para o pericarpo através da parede celular, sem qualquer interferência da atividade do simplasto.

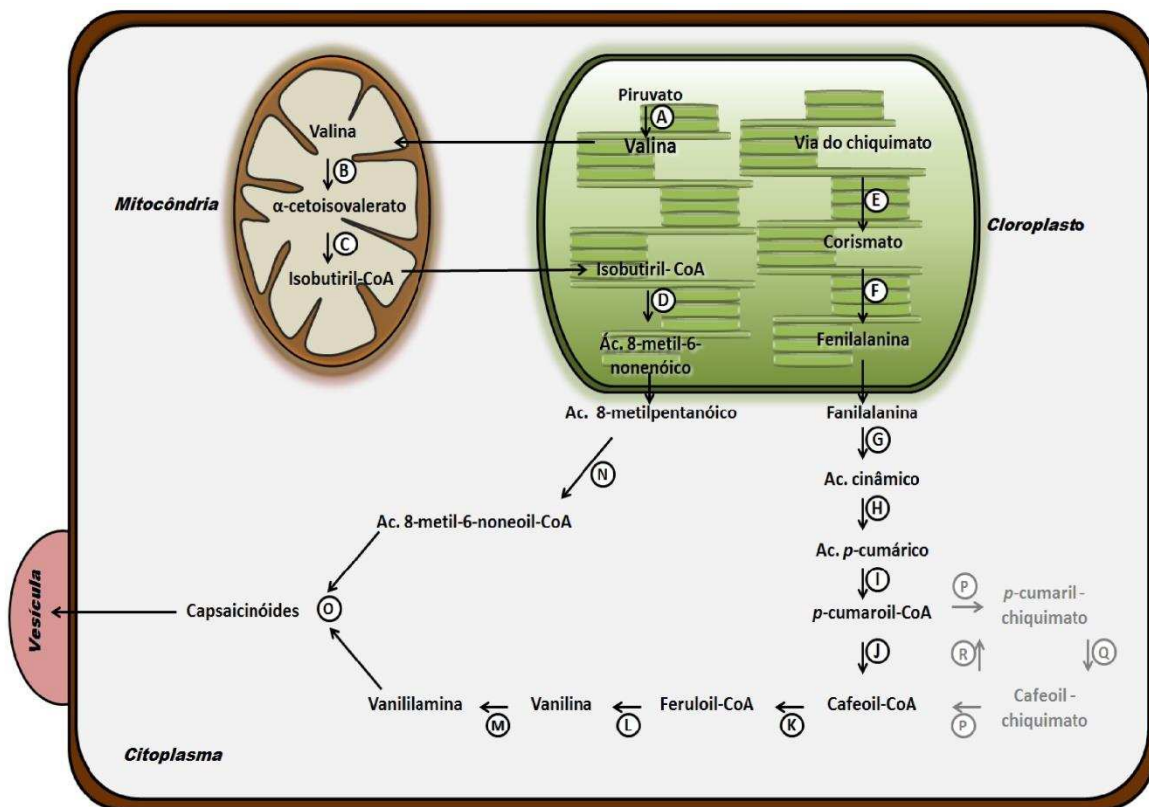


Figura 1 - Rota de biossíntese de capsaicinóides. Condensação da vanililamina, da rota dos fenilpropanóides, com ácidos graxos de cadeia ramificada, Abreviações: **A**- Acetolactato sintase (AHAS), Cetoisovalerato (CIV); **B**- Aminotransferase (BCAT); **C**- α -cetoácido descarboxilase (BCKDH); **D**- Acil-ACP tioesterase (FatA); **N**- Acil-CoA sintetase(ACS); **O**- Capsaicina sintase (CS); **E**- Corismato sintase (CS); **F**- Corismato mutase **G**- Fenilalanina amônia-liase (PAL); **H**- Cinamato 4- hidroxilase (C4H); **I**- 4- cumaril-CoA ligase (4CL); **P**- Hidroxicinamoil transferase (HCT); **Q**- P- cumaril chiquimato (C3H); **R**- P- cumaril chiquimato (C3H); **J**- Coenzima A ; **K**- Cafeoil-CoA 3-O- metiltransferase (COMT); **L**- Hidroxicinamoil- CoA hidratase liase (HCHL); **M**- Aminotransferase (AMT). Etapas apresentadas em letras cinza representam rotas alternativas para a formação de Cafeoil- Coa.

Estes compostos têm sido estudados e amplamente utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica (Lee et al., 1996; Schulzeck & Wulf, 1997; Caterina et al., 2000; Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001; Daood et al., 2002; Liu et al., 2013). Tem-se observado que os capsaicinóides possuem propriedades anti-cancerígenas, anti-artríticas e analgésicas (Luo et al., 2011; Liu et al., 2013). Em adição, os frutos de *C. chinense* são reconhecidos como excelentes fontes de carotenóides (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E) e flavonóides (Howard & Wildman, 2007; Topuz & Ozdemir, 2007; Wahyuni et al., 2011). Estes compostos antioxidantes exercem efeitos biológicos por meio da captura de radicais livres, ligação e interação com proteínas relacionadas a vias de transdução de sinais em humanos (Edge et al., 1997; Padayatty et al., 2003; Wahyuni et al., 2011).

Dentre a composição bioquímica dos frutos destacam-se os pigmentos e os açúcares. Segundo Sun et al. (2007) em *C. annum* L a clorofila é responsável pela coloração verde, as antocianinas pelo roxo, α - e β -caroteno, zeaxantina, luteína e β -criptoxantina expressam o amarelo/laranja e carotenóides com formas oxigenadas como capsantina, capsorubina e capsantina- 5,6-epóxido controlam os tons de vermelho. Em adição, capsantina e capsorubina são os principais pigmentos das pimentas, uma vez que são específicos dos frutos dessas espécies e são sintetizados pela enzima capsantina- capsorubina sintase (CCS) (Huguene et al., 1995; Kim et al., 2014). Glicose, frutose e sacarose são os principais açúcares presentes em frutos de *C. chinense* tendo aumentos contínuos nos seus níveis durante o desenvolvimento do fruto até 52 DAA. Após esse estágio, esses açúcares estabelecem padrão semelhante de declínio (Osorio et al., 2012).

Outros metabólitos secundários, como os polifenóis derivados do ácido cinâmico, estão também sendo amplamente estudados devido às suas atividades antioxidantes e por serem intermediários de rotas importantes para a biossíntese de compostos como capsaicinóides e flavonóides (Materska et al., 2003; Broderick & Cooke, 2007; Wahyuni et al., 2013a).

O teor de sólidos solúveis vem sendo considerado como uma característica importante em termos de pós-colheita (Lannes et al., 2007a). Essa característica é influenciada por vários metabólitos que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento do fruto fazendo com que de modo geral a tendência do teor de sólidos solúveis seja o incremento em estádios mais avançados. Em tomates os açúcares representam em torno de 55% do teor de sólidos solúveis totais (TSS) (Helyes et al., 2006). Ressalta-se também, que, outros metabólitos como malato e amido são importantes para o aumento do TSS em estádios mais avançados do desenvolvimento em frutos de tomates (Schaffer & Petreikov, 1997; Baxter et al., 2005; Centeno et al., 2011). Essa característica é influenciada pela espécie, método de cultivo e condições ambientais em que as plantas são expostas ao longo do desenvolvimento (Helyes et al., 2006). Entretanto ainda não é sabido como algumas rotas de biossíntese e degradação de outros compostos que não os citados acima, influenciam no teor de sólidos solúveis.

Embora haja uma forte influência para o melhoramento visando resistência a viroses e outras doenças, considerável interesse tem sido expresso na busca de novas cultivares com a qualidade de frutos como principal característica. Entre as características

relacionadas à qualidade dos frutos destacam-se tamanho, forma, cor, firmeza e composição bioquímica (Reifschneider, 2000; Finger et al., 2010). Embora as características morfológicas continuem sendo importantes, maior interesse em programas de melhoramento que visam o incremento de compostos que favoreçam a nutrição humana tem sido observado. Tendo em vista esse interesse, é necessário que se entenda as complexas redes de controle de características fenotípicas a fim de gerar informações passíveis de serem utilizadas nestes programas. Diante disso, este trabalho objetivou investigar as características metabólicas que explicariam os teores de capsaicinóides e sólidos solúveis totais durante o desenvolvimento de frutos utilizando 10 acessos fenotipicamente contrastantes de *C. chinense*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições experimentais

O Banco de Germoplasma de Hortaliças localizado na Universidade Federal de Viçosa armazena uma das maiores coleções de *Capsicum* spp. do Brasil. Entre 49 acessos de *C. chinense* utilizados anteriormente por nossos grupos de pesquisa (Lannes et al., 2007a; Rosado-Souza et al., 2015), oito acessos com características de frutos contrastantes quanto ao formato (frutos redondos e alongados), coloração (frutos vermelhos e alaranjados/amarelos) e teor de capsaicina (frutos picantes e doces), e não discrepantes em termos de parâmetros fisiológicos avaliados em folhas (Rosado-Souza et al., 2015), foram selecionados (Figura 2). Além dos oito acessos, duas cultivares comerciais da mesma espécie, habanero (picante) e biquinho (doce), foram utilizados como controles contrastantes e denominadas Ac1 e Ac2 respectivamente.

As sementes foram germinadas em substrato comercial (Plantmax, DDL Agro Indústria) e as plântulas transplantadas após aproximadamente 25 dias para vasos de 5 litros contendo uma mistura de solo e substrato (2,7:1 p/p) fertilizado com 3,5 g de calcário, 3,5 g de superfosfato e 1 kg de esterco bovino por kg de solo. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação localizada em Viçosa (642 m altitude, 20°45' S latitude e 42°51' W longitude), regularmente regadas e fertilizadas semanalmente com 40 mL de solução contendo 5,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 g de KCl por litro.

Para a determinação precisa da idade fisiológica de cada fruto utilizado neste estudo, as flores foram marcadas no período da antese conforme indicado em Osorio et al. (2012) e

amostras de pericarpo de frutos em estádios de 20, 45 e 60 dias após a antese foram coletadas aproximadamente ao meio dia para análise da variação metabólica ao longo do desenvolvimento. Estas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Para cada análise foram utilizadas seis réplicas, que correspondem a frutos coletados de plantas diferentes de cada acesso.

2.2 Determinação da pungência

A pungência dos frutos foi avaliada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de acordo com a metodologia proposta por Maillard et al. (1997), com as seguintes modificações. Cerca de 15 mg de massa seca (MS) de pericarpo de frutos já macerados foram misturados a 2 ml de metanol:água (60:40, v/v) e sonicados por 15 min à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada à 4000 rpm por 15 min e o sobrenadante coletado para análise após filtração em membrana Millipore de 0,2 µm. Amostras de 30 µl do filtrado foram injetadas em HPLC com detector UV a 229 nm e 281 nm, e equipado com coluna C18 (150 mm, com tamanho de partícula de 3 µm de diâmetro). A fase móvel para separação dos capsaicinóides foi composta por uma mistura de metanol:água:ácido acético (70:28:2, v/v/v) com fluxo de 1,0 ml/min a 20°C em gradiente isocrático. A quantificação relativa dos capsaicinóides totais foi obtida pela soma da área dos picos para capsaicina e dehidrocapsaicina normalizados pela matéria seca da amostra.

2.3 Determinação de metabólitos primários

Amostras do pericarpo foram submetidas à extração etanólica, determinando-se na fração solúvel os teores de glicose, frutose, sacarose (Fernie et al., 2001) e aminoácidos totais de acordo com a metodologia descrita por Cross et al. (2006) e na fração insolúvel, os teores de amido e proteínas totais conforme descrito na literatura (Fernie et al., 2001; Gibon et al., 2004). Os níveis de malato e fumarato foram determinados conforme o método descrito por Nunes -Nesi et al. (2007).

2.4 Teor de sólidos solúveis totais (TSS)

O TSS dos frutos foi avaliado em refratômetro do tipo Refratômetro Portátil Digital com ATC 106-D Biobrix, e expresso em Brix° (Lannes et al., 2007a).

2.5 Determinação de pigmentos

Para determinação do conteúdo de clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e carotenóides totais conforme descrito por (Wellburn, 1994) com modificações, utilizou-se 40 mg de amostra homogeneizada com 2 ml de acetona 80% e CaCO₃ para inativação de clorofilases, a qual foi deixada em repouso no escuro por 30 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado à 15000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante coletado foi lido em absorvâncias de 470, 646 e 663 nm em espectrofotômetro.

Para calcular as concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e carotenóides totais em mg.L⁻¹ utilizou-se as seguintes formulas:

$$\text{Clorofila a} = C_a = 12,25. A_{663} - 2,79. A_{646}$$

$$\text{Clorofila b} = C_b = 21,50. A_{646} - 5,10. A_{663}$$

$$\text{Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15. A_{663} + 18,71. A_{646}$$

$$\text{Carotenóides}_{(\text{xantofilas}+\text{carotenos})} = (1000. A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b)/198$$

2.6 Determinação de fenóis solúveis totais

Os fenóis solúveis totais foram quantificados em espectrofotômetro utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu como descrito por (Sun et al., 2007). Para expressa-los em mg.g⁻¹ foi utilizado uma curva de calibração contendo ácido tânico como padrão.

2.7 Parâmetros biométricos

Porcentagem de matéria seca (%MS) foi determinada conforme (Lannes et al., 2007a): a % MS foi determinada pela expressão:

$$\%MS = (ms/mf) * 100$$

Onde: mst = Matéria seca (MS)

mft = Matéria fresca (MF)

2.8 Determinação de metabólitos secundários

A quantificação de metabólitos secundários foi realizada em HPLC como descrito em (Keinänen et al., 2001) com modificações. Utilizou-se 50 mg de massa seca de

amostra. Este material foi submetido à mesma extração etanólica na qual os metabólitos primários foram extraídos.

O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore de 0,2 µm e amostras de 50 µl foram injetadas no HPLC com detector UV a 210, 254, 320 e 365 nm. O gradiente de eluição foi composto de: Fase A- 0,25% de H₃PO₄ em H₂O ultrapura (pH 2.2), Fase B- Acetonitrila 100%, e a programação de corrida: 0- 6 min (0-12% B), 6-10 min (12-18% B) e 10-30 min (18-58% B) com fluxo de 1 ml/min em coluna C18 (150mm; 3.5µm). A identificação e concentração dos metabólitos foram estimadas pela comparação com o tempo de retenção e a curva de calibração contendo a mistura dos padrões para cada composto.

2.9 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições para cada acesso considerando a homogeneidade do ambiente. A unidade experimental utilizada foi uma planta por vaso. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2006). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (Material suplementar- Tabela 1) com teste F a 5%, estes sendo significativos foram submetidos ao teste de TUKEY a 5% de probabilidade. A correlação linear de Pearson foi utilizada para o estudo das relações entre variáveis determinadas.

Análises multivariadas foram realizadas para simplificar a estrutura dos dados, para isso utilizou-se a distância genética de Mahalanobis agrupadas no método de otimização de Tocher modificado e agrupamento hierárquico (UPGMA) (CRUZ, 2006). Para testar a consistência dos agrupamentos, foi realizada a análise discriminante de Anderson para o método de otimização de Tocher modificado e a verificação da correlação cofenética para o método UPGMA.

3 RESULTADOS

3.1 Variabilidade e desenvolvimento de frutos

Com o intuito de demonstrar a variabilidade fenotípica entre os acessos selecionados e sua plasticidade ao longo do desenvolvimento, os frutos de 10 acessos foram

fotografados, todos no mesmo período após a antese pré-definidos (20, 45 e 60 DAA). Nota-se que a diversidade de formas, tamanhos e coloração foi variável entre os acessos ao longo do desenvolvimento (Figura 2). Destacam-se os acessos 17, 18, 54 e 83 com formato mais alongado e os demais, (06, 26, 100 e 101) com formato mais arredondados.

Interessantemente, mesmo com a coleta coordenada alguns acessos apresentaram variabilidade em termos de maturação. Este fato foi mais evidenciado no acesso 06 em 45 DAA. Embora apenas este acesso apresente coloração esverdeada, outros acessos exibiram uma transição de imaturo para maduro mais tardiamente.

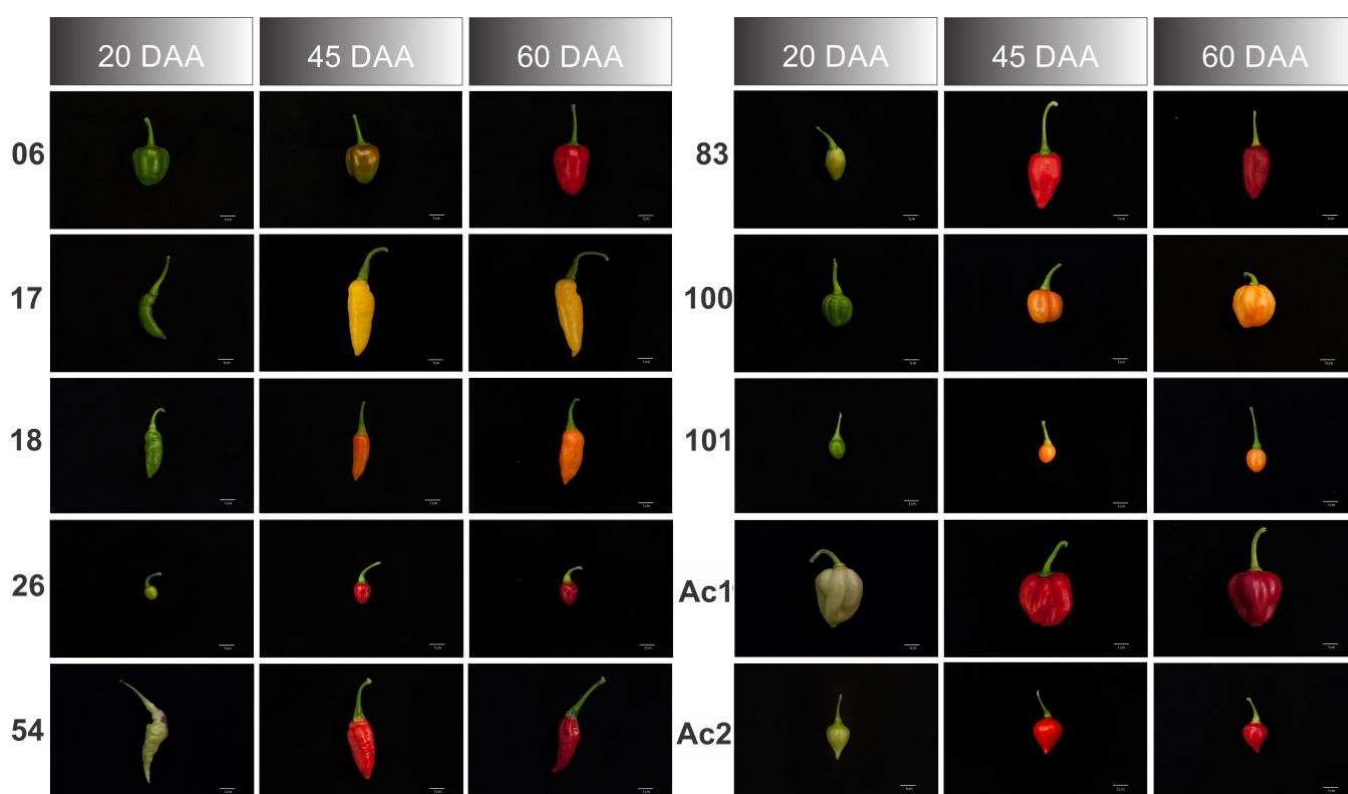


Figura 2 – Variabilidade fenotípica de 10 acessos de *Capsicum chinense* indicados em números, em três estádios de desenvolvimento- 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). **Ac1**- cultivar comercial Habanero; **Ac2**- cultivar comercial Biquinho.

3.2 Determinação de Capsaicinóides e Brix° ao longo do desenvolvimento de frutos de diferentes acessos de *C.chinense*

Para demonstrar a variabilidade em relação à pungência de frutos, foi realizada a quantificação de Capsaicinóides (Capsaicina + Dehidrocapsaicina). Observou-se que metade dos acessos estudados apresentaram valores elevados de capsaicinóides, os quais ao longo do período de desenvolvimento dos frutos, na maioria das vezes, apresentaram um incremento até 45 DAA seguidos de uma redução em 60 DAA em sua maior parte

significativa, estes representados pelos acessos Ac1, 101, 54, 26 e 100(Figura 3A). Entre os acessos picantes, a cultivar comercial (Habanero, Ac1) apresentou os maiores teores quando comparado aos demais acessos. Ainda quando comparamos os acessos picantes, os que tenderam a não apresentar uma redução aos 60 DAA foram os frutos dos acessos 26 e 100, no qual apresentam tamanho reduzido como visto na Figura 2. Por outro lado, os acessos Ac2, 06, 17, 18 e 83 apresentaram teores muito inferiores de capsaicinóides quando comparados aos demais já citados, sendo em alguns casos não detectados pelo método utilizado (Figura 3A). Entre os acessos não picantes, apenas os acessos 17 e 18 apresentaram níveis detectáveis aos 45DAA, embora as diferenças não tenham sido significativas em comparação com os demais acessos não picantes.

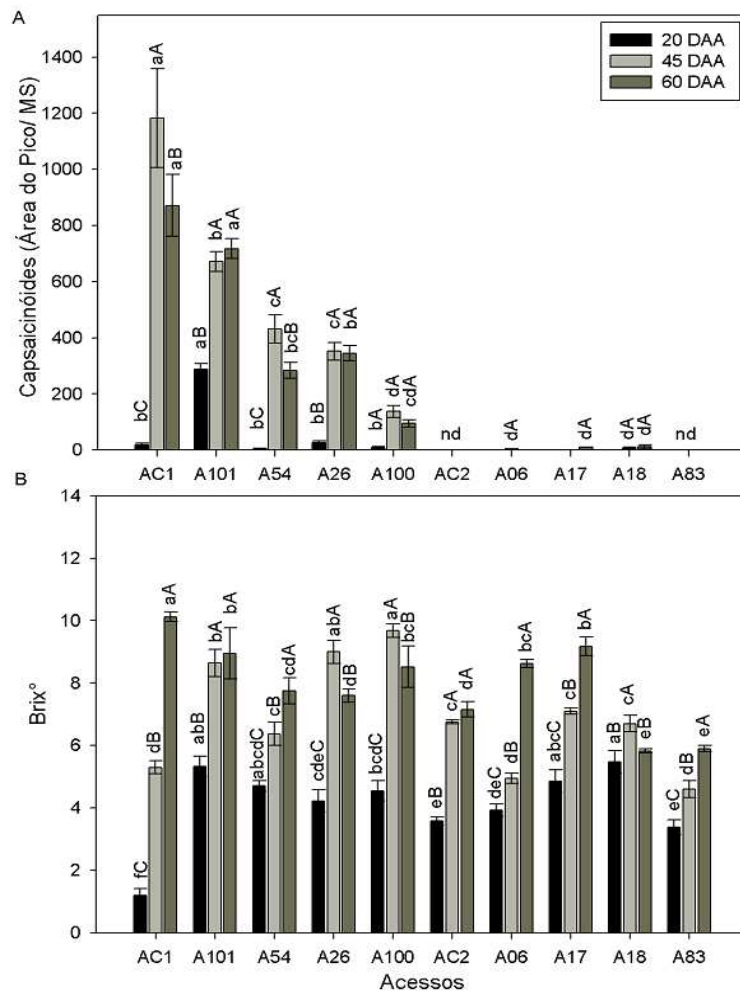


Figura 3 – (A) Teores de capsaicinóides de 10 acessos de *Capsicum chinense* em três estádios de desenvolvimento: 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). (B) Teor de sólidos solúveis (TSS) de 10 acessos de *C. chinense* em três estádios de desenvolvimento: 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). Barras representam médias \pm erro padrão (n=6). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ao longo do tempo e letras minúsculas diferença estatística entre os acessos, dados submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade (Material suplementar –Tabela 1).

No geral os teores de sólidos solúveis tenderam a aumentar ao longo do tempo (Figura 3B). Entretanto os acessos 18, 26 e 100 apresentaram um aumento até 45 DAA, mas este teor reduziu em 13, 15.5 e 11.8% respectivamente, quando em 60 DAA. Além disso, o Ac1 aos 20 DAA apresentou o menor TSS e aos 60 DAA os valores aumentaram, diferindo estatisticamente dos demais acessos nestes estádios (Figura 3B).

3.3 Variações nos níveis de metabólitos primários e secundários ao longo do desenvolvimento de frutos de acessos de *C. chinense*

Para compreender a variação fenotípica dos frutos dos 10 acessos de *C. chinense*, uma caracterização metabólica foi realizada. Verificou-se que parte dos metabólitos relacionados ao metabolismo do nitrogênio como aminoácidos e proteínas não apresentaram diferenças entre os acessos (Tabela 1). Essas duas variáveis na maioria das vezes apresentaram comportamento oposto uma da outra, aminoácidos apresentaram no geral um incremento ao longo do tempo e proteínas um decréscimo seguido de um pequeno incremento (Figura 4).

Como esperado, os teores das clorofilas, no geral apresentaram um decréscimo ao longo do desenvolvimento. Este decréscimo foi mais acentuado para clorofila b, apresentando uma redução significativa já aos 45 DAA, o que não ocorre com clorofila a que só obteve decréscimo significativo aos 60 DAA, principalmente nos acessos Ac1, 26 e 06 com amadurecimento mais tardio, confirmado pelo incremento nos teores de amido até 45 DAA (Tabela 1; Figura 4).

Os ácidos orgânicos avaliados, malato e fumarato apresentaram um decréscimo acentuado e significativo ao longo do desenvolvimento do fruto. Malato naturalmente está presente em maiores quantidade em relação ao fumarato em frutos de *C. chinense*, visto que todos os acessos aos 20 DAA apresentaram uma quantidade reduzida de fumarato. Observou-se também que estas quantidades reduziram drasticamente, e não foram detectadas em frutos com 60 DAA (Tabela 1; Figura 4).

Tabela 1 – Metabólitos primários e secundários de frutos de acessos de *C. chinense*. Abreviações: **Aas**, aminoácidos totais $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$; **Pro T**, proteína total $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; **Chl a**, clorofila a $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; **Chl b**, clorofila b $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; **Chl T**, clorofilas totais $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; **Car T**, carotenóides totais $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; **Fe T**, fenóis solúveis totais $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$; ácidos orgânicos e açúcares, $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$; amido, μmol de glicose. g^{-1}MS ; NA, não detectado.

	Aas	Pro T	Chl a	Chl b	Chl T	Malato	Fumarato	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido	Car T	Fe T	
Ac1	20 DAA	257.60 ± 11.56 cdC	84.94 ± 14.37 aA	1.53 ± 0.25 aA	0.37 ± 0.03 cA	1.91 ± 0.26 bcA	1439.75 ± 75.40 bA	56.07 ± 7.69 aA	411.50 ± 61.50 bb	265.64 ± 59.00 bcB	23.66 ± 3.75 aB	72.96 ± 13.01 bcA	0.18 ± 0.04 aB	25.02 ± 2.40 abAB
	45 DAA	295.83 ± 48.33 dB	56.60 ± 6.04 aA	1.73 ± 0.25 abA	0.30 ± 0.04 bcdeA	2.03 ± 0.25 abA	612.74 ± 48.53 bcB	22.86 ± 7.30 bb	445.19 ± 41.32 cdeB	450.28 ± 48.03 cdeB	104.22 ± 14.95 cdefA	102.49 ± 14.47abA	0.29 ± 0.05 bcB	30.75 ± 3.97 bA
	60 DAA	438.01 ± 41.34 bcdeA	63.79 ± 14.86 acA	0.08 ± 0.006 aB	0.23 ± 0.01 aA	0.32 ± 0.01 aB	24.85 ± 4.44 aC	NA	769.96 ± 44.40 bcA	846.48 ± 17.63 abA	43.10 ± 3.66 aAB	1.03 ± 0.34 aB	0.80 ± 0.05 cdA	23.95 ± 0.83 cdB
A101	20 DAA	65.27 ± 16.64 aC	62.81 ± 9.57 aA	1.57 ± 0.07 aA	1.10 ± 0.12 aA	2.68 ± 0.18 abA	1581.81 ± 45.95 bA	24.16 ± 2.01 bcA	266.97 ± 24.47 bb	325.91 ± 34.83 abcB	54.34 ± 6.95 aA	93.72 ± 16.37 abA	0.16 ± 0.28 aA	25.67 ± 0.55 abA
	45 DAA	97.10 ± 20.77 aA	54.71 ± 10.27 aA	1.00 ± 0.23 bA	0.07 ± 0.03 eB	0.94 ± 0.20 cB	912.52 ± 80.34 bb	33.85 ± 3.20 abA	953.40 ± 50.32 aA	907.42 ± 37.35 aA	97.71 ± 14.29 defA	33.39 ± 11.51 cdA	0.31 ± 0.05 bcA	29.83 ± 1.15 bA
	60 DAA	154.73 ± 15.72 abcB	52.59 ± 5.42 abcA	0.20 ± 0.07 aB	0.20 ± 0.02 aB	0.38 ± 0.06 aB	29.50 ± 6.81 aC	NA	761.86 ± 72.70 bcA	884.30 ± 53.43 abA	52.68 ± 6.97 aA	1.56 ± 0.13 aB	0.12 ± 0.01 fA	26.92 ± 2.59 bcA
A54	20 DAA	146.04 ± 35.65 abA	78.09 ± 7.26 aA	1.22 ± 0.24 aA	0.29 ± 0.05 cA	1.52 ± 0.21 cA	1540.05 ± 85.59 bA	12.85 ± 1.38 cB	191.62 ± 21.25 bb	214.16 ± 29.64 bcB	52.22 ± 5.68 aB	125.62 ± 11.05 aA	0.17 ± 0.05 aB	26.04 ± 1.52 abA
	45 DAA	400.25 ± 49.52 cdA	58.22 ± 10.25 aA	1.38 ± 0.19 abA	0.14 ± 0.03 cdeA	1.37 ± 0.13 bcA	614.09 ± 32.42 bcB	47.85 ± 8.05 abA	259.62 ± 11.67 eB	264.28 ± 15.28 deB	187.36 ± 18.67 abcA	79.04 ± 2.57 bcB	0.25 ± 0.05 cB	29.83 ± 1.20 bA
	60 DAA	452.11 ± 59.3 deA	51.70 ± 14.33 abcA	0.28 ± 0.05 aB	0.27 ± 0.02 aA	0.56 ± 0.05 aB	27.09 ± 2.31 aC	NA	776.13 ± 70.61 bcA	786.44 ± 64.74 bcA	28.02 ± 6.46 aB	1.39 ± 0.49 aC	0.58 ± 0.08 deA	24.30 ± 1.99 cdA
A26	20 DAA	173.51 ± 15.3 bA	65.52 ± 5.07 aA	1.99 ± 0.18 aA	0.50 ± 0.14 cA	2.49 ± 0.25 abcA	1112.01 ± 57.16 cB	23.56 ± 5.32 bcB	263.86 ± 6.33 bb	115.35 ± 13.78 cB	26.85 ± 2.88 aB	63.51 ± 11.31 bcA	0.25 ± 0.04 aB	28.77 ± 2.71 aA
	45 DAA	379.63 ± 34.98 bcB	44.21 ± 7.89 aA	1.23 ± 0.21 abB	0.51 ± 0.16 bcA	1.42 ± 0.12 bcB	1450.61 ± 86.53 aA	44.65 ± 5.57 abA	239.05 ± 77.25 eB	196.01 ± 85.47 eB	163.51 ± 22.28 bcDA	93.26 ± 11.95 bA	0.66 ± 0.01 aA	28.62 ± 2.06 bcA
	60 DAA	257.51 ± 24.36 aA	73.03 ± 14.55 abcA	0.07 ± 0.01 aC	0.25 ± 0.06 aA	0.33 ± 0.06 aC	23.26 ± 2.22 aC	NA	534.11 ± 42.65 bcA	498.16 ± 42.68 cA	34.79 ± 3.46 aB	0.47 ± 0.04 aB	0.29 ± 0.05 efB	23.04 ± 1.71 cdA
A100	20 DAA	81.93 ± 9.64 cD	45.74 ± 6.11 aA	2.15 ± 0.33 aA	0.92 ± 0.11 abA	3.08 ± 0.40 aA	1580.13 ± 62.93 bA	35.56 ± 2.81 bcA	716.34 ± 79.71 aB	612.17 ± 84.42 aB	20.53 ± 9.33 aB	94.65 ± 30.63 abA	0.27 ± 0.05 aA	25.12 ± 1.51 abB
	45 DAA	199.04 ± 32.3 bcDA	36.87 ± 7.34 aA	1.41 ± 0.22 abB	0.09 ± 0.03 deB	1.34 ± 0.20 bcB	1259.20 ± 62.93 abA	42.07 ± 9.31 abA	573.51 ± 138.19 bcDB	548.01 ± 119.77 bcDB	225.63 ± 87.24 abA	81.58 ± 21.00 bcA	0.35 ± 0.05 abcA	29.23 ± 2.19 bcAB
	60 DAA	166.53 ± 51.15 efB	37.96 ± 3.23 cA	0.50 ± 0.13 aC	0.29 ± 0.008 aB	0.68 ± 0.12 abA	65.25 ± 29.96 aC	NA	1213.41 ± 110.41 aA	1120.04 ± 67.40 aA	24.09 ± 8.83 aB	0.34 ± 0.11 aB	0.11 ± 0.03 fA	34.99 ± 1.57 abA
Ac2	20 DAA	314.70 ± 58.71 abcB	76.61 ± 10.01 aA	1.77 ± 0.23 aA	0.57 ± 0.11 bcA	2.34 ± 0.28 abcA	1979.78 ± 123.91 aA	50.97 ± 20.45 abA	170.11 ± 19.70 bb	211.97 ± 17.08 bcB	41.90 ± 3.34 aA	105.64 ± 12.17 abA	0.20 ± 0.03 aC	28.12 ± 2.99 aA
	45 DAA	290.24 ± 61.16 bcA	22.11 ± 2.82 aB	1.11 ± 0.38 abA	0.47 ± 0.0003 bcDA	1.14 ± 0.25 bcB	1425.62 ± 93.06 aB	30.72 ± 2.26 abA	601.46 ± 39.69 bcDA	794.90 ± 62.74 abA	32.78 ± 8.71 fA	8.32 ± 2.13 dB	0.61 ± 0.12 abB	27.88 ± 2.97 bcA
	60 DAA	303.08 ± 56.68 efB	55.28 ± 14.15 abcA	0.29 ± 0.07 aB	0.32 ± 0.08 aA	0.56 ± 0.08 aB	56.81 ± 12.67 aC	NA	704.17 ± 128.43 bcA	990.39 ± 177.78 abA	21.83 ± 4.33 aA	0.53 ± 0.14 aB	1.08 ± 0.08 bcA	25.04 ± 1.71 cdA
A06	20 DAA	197.06 ± 27.37 abcB	72.22 ± 11.41 aA	1.67 ± 0.06 aA	1.23 ± 0.12 aA	2.90 ± 0.12 aA	922.34 ± 47.39 cA	35.37 ± 4.97 bcA	331.76 ± 9.19 bb	209.86 ± 20.04 bcC	36.01 ± 3.04 aB	80.69 ± 6.88 abcB	0.16 ± 0.04 aB	17.19 ± 1.13 bA
	45 DAA	307.57 ± 48.87 bcA	53.93 ± 11.33 aA	1.57 ± 0.16 abA	0.93 ± 0.10 aB	2.51 ± 0.22 aA	518.92 ± 63.16 cB	26.57 ± 2.48 bA	389.64 ± 71.08 deB	433.78 ± 71.49 cdeB	256.00 ± 34.35 aA	150.53 ± 20.92 aA	0.22 ± 0.02 cB	20.15 ± 1.23 cA
	60 DAA	276.31 ± 24.54 abcdA	47.14 ± 6.26 bcA	0.13 ± 0.05 aB	0.18 ± 0.01 aC	0.31 ± 0.04 aB	39.83 ± 3.48 aC	NA	853.54 ± 82.52 bA	796.62 ± 54.90 bA	51.73 ± 11.41 aB	1.30 ± 0.39 aC	1.20 ± 0.12 bA	16.60 ± 1.23 dA
A17	20 DAA	283.12 ± 65.57 abcB	71.81 ± 13.50 aA	1.56 ± 0.12 aA	1.07 ± 0.12 aA	2.64 ± 0.17 abA	1022.27 ± 41.83 cA	37.56 ± 6.16 bcA	357.57 ± 16.27 bb	451.81 ± 36.79abB	29.60 ± 6.98 aA	72.58 ± 12.81 bcA	0.13 ± 0.05 aA	31.46 ± 3.75 aB
	45 DAA	462.98 ± 21.97 ab	53.80 ± 4.94 aA	1.17 ± 0.35 abA	0.31 ± 0.10 bcdeB	1.23 ± 0.25 bcB	800.96 ± 33.57 bcA	37.13 ± 7.12 abA	710.93 ± 36.79 abcA	867.42 ± 38.06 aA	65.14 ± 15.86 efA	13.12 ± 4.16 dB	0.35 ± 0.07 abcA	40.59 ± 0.80 aA
	60 DAA	467.55 ± 55.19 abA	83.24 ± 12.39 abA	0.24 ± 0.10 aB	0.14 ± 0.02 aB	0.39 ± 0.08 aC	39.18 ± 8.23 ab	NA	709.71 ± 54.54 bcA	1003.96 ± 48.07 abA	55.09 ± 5.63 aA	0.58 ± 0.13 aB	0.10 ± 0.02 fA	27.68 ± 0.90 bcB
A18	20 DAA	288.99 ± 35.31 abcB	56.66 ± 3.57 aB	1.41 ± 0.11 aA	1.06 ± 0.08 aA	2.48 ± 0.17 abcA	2095.53 ± 159.82aA	29.45 ± 9.15 bcA	348.05 ± 19.64 bb	370.57 ± 18.90 abcC	22.96 ± 3.09 aB	68.17 ± 6.54 bcA	0.08 ± 0.01 aA	22.74 ± 2.12 abC
	45 DAA	466.89 ± 29.51 bcA	63.91 ± 6.38 aAB	1.59 ± 0.40 abA	0.40 ± 0.12 bcdeB	1.99 ± 0.46 abA	489.00 ± 93.92 cB	30.75 ± 7.64 abA	435.88 ± 95.44 bcdeAB	622.16 ± 43.32 abcB	100.06 ± 23.67 cdeA	27.40 ± 5.00 dB	0.30 ± 0.06 bcA	33.56 ± 1.64 abB
	60 DAA	535.91 ± 20.38 cdeA	94.69 ± 16.68 aA	0.12 ± 0.03 aB	0.21 ± 0.02 aB	0.33 ± 0.01 aB	33.06 ± 4.59 aC	NA	677.89 ± 37.85 bcA	893.22 ± 29.26 abA	54.73 ± 6.93 aB	0.52 ± 0.16 aB	0.12 ± 0.02 fA	41.40 ± 1.72 aA
A83	20 DAA	84.51 ± 17.72 bcDA	40.79 ± 3.45 aA	1.81 ± 0.25 aA	0.65 ± 0.09 bcA	2.47 ± 0.31 abcA	2052.81 ± 175.24 aA	24.39 ± 10.94 bcB	782.31 ± 78.68 aA	433.31 ± 90.88 abcC	18.32 ± 5.83 aA	39.97 ± 6.94 cA	0.22 ± 0.03 aC	22.52 ± 1.15 abB
	45 DAA	523.34 ± 35.82 eA	45.75 ± 9.50 aA	2.00 ± 0.45 aA	0.56 ± 0.21 abA	2.46 ± 0.43 aA	671.47 ± 79.71 bcB	56.95 ± 10.50 aA	809.10 ± 78.94 abA	681.57 ± 82.86 abcB	46.03 ± 8.73 efA	43.01 ± 4.16 cdA	0.60 ± 0.12 abB	33.64 ± 1.83 abA
	60 DAA	326.90 ± 25.26 fA	55.88 ± 7.08 abcA	0.57 ± 0.10 aB	0.27 ± 0.06 aB	0.79 ± 0.13 aB	29.72 ± 8.02 aC	NA	923.40 ± 69.39 bA	983.76 ± 66.34 abA	19.5 ± 2.01 aA	0.79 ± 0.24 aB	1.83 ± 0.18 aA	26.63 ± 2.39 bcB

Médias ± erro padrão (n=6). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ao longo do tempo e letras minúsculas diferenças estatísticas entre os acessos, dados submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

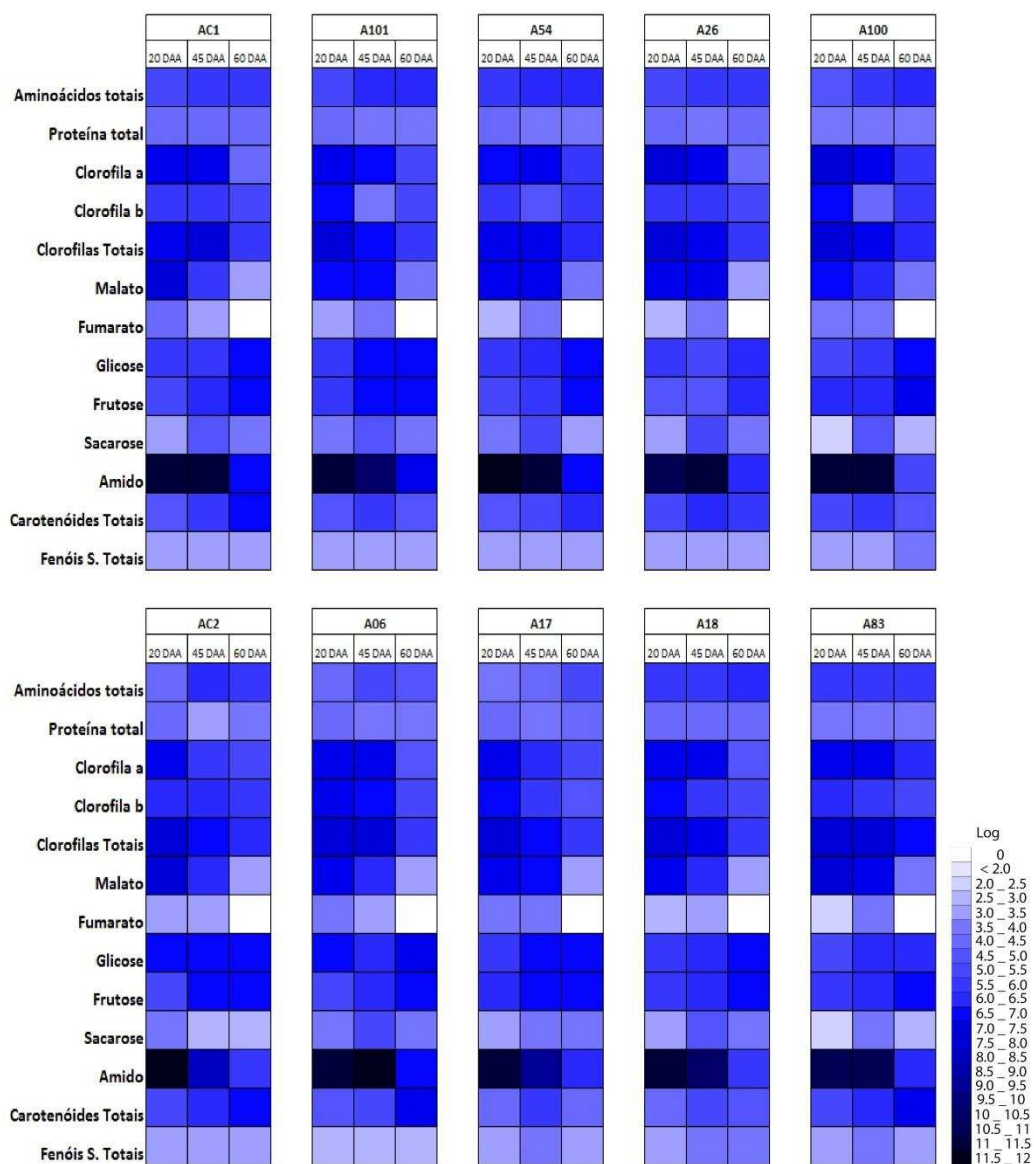


Figura 4 - Mapa de cores representando os níveis de metabólitos extraídos a partir de frutos de 10 acessos de *C. chinense*, coletados aos 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). Quadrados representam médias transformadas de logaritmo neperiano \pm erro padrão ($n=6$), em escala, menores intensidades de cor azul representam valores próximos a zero.

Os teores de glicose e frutose apresentaram um incremento significativo ao longo do desenvolvimento e similaridade em quantidades. Entretanto sacarose está presente em teores muito inferiores aos demais açúcares quantificados. Interessantemente o acesso 100 apresentou os maiores teores de glicose e frutose, em relação aos demais acessos que no geral não diferiram significativamente entre si (Tabela 1; Figura 4).

Os teores de amido apresentaram o mesmo padrão observado para a sacarose, evidenciando um decréscimo ao longo do tempo com diferença significativa apenas aos 60 DAA. Entretanto os acessos Ac1, 26 e 06 continuaram acumulando amido até 45 DAA, justificado por um decréscimo menos acentuado nos teores de clorofilas em resposta a um

amadurecimento tardio quando comparados aos outros acessos analisados (Tabela 1; Figura 4).

Os carotenóides totais no geral apresentaram um incremento ao longo do desenvolvimento, entretanto os acessos 17, 18, 26, 100 e 101 tiveram esse aumento até 45 DAA. Os acessos 83 e Ac1 foram os únicos que diferiram significativamente em todos os estádios, para os demais acessos não foi observada diferença. Já os teores de fenóis solúveis totais permaneceram constantes ao longo do tempo, com exceção do acesso 18 que apresentou um incremento significativo durante o amadurecimento (Tabela 1; Figura 4).

Para verificar os níveis dos metabólitos secundários, a variação dos mesmos ao longo do desenvolvimento e a relação com os níveis de capsaicinóides e TSS observados em frutos dos 10 acessos de *C. chinense* estudados, foi determinado o perfil de metabólitos secundários. No total foram quantificados 19 metabólitos, incluindo flavonóides como flavonas, chalconas, flavononas, flavonóis e hidroxiflavonas, ácidos fenólicos e outros fenóis (Figura 5, 6 e 7).

Os flavonóides apresentaram padrões diferenciados para cada metabólito. Chalcona e 4- hidroxiflavona apresentaram comportamento diversificado entre os acessos. Com exceção de genisteína e kaempferol, os demais não apresentaram diferenças significativas que se mantivessem estáveis ao longo do desenvolvimento. Todos os acessos estudados apresentaram redução nos teores de quercetina, naringenina, 7- hidroxiflavona e genisteína, entretanto em sua totalidade, kaempferol foi incrementado ao longo do desenvolvimento (Figura 5). Interessantemente, todos os acessos apresentaram um decréscimo próximo a 100% de naringenina ao longo do desenvolvimento.

Análises de outros grupos de metabólitos secundários como ácidos fenólicos e polifenóis, demonstraram a plasticidade do metabolismo secundário. Verificou-se que estes compostos não seguem o padrão estável dos fenóis solúveis totais que estão aqui representados. Ácidos fenólicos como ácido hidroxicinâmico e ácido cafeico apresentaram um incremento ao longo do desenvolvimento muitas vezes significativo. Por outro lado, os teores de ácido clorogênico, ácido ferúlico e isoferúlico tenderam à redução em estádios mais avançados do desenvolvimento (Figura 6). Interessantemente, o ácido cafeico apresentou teores mais elevados quando comparado aos outros ácidos fenólicos.

Flavonóides

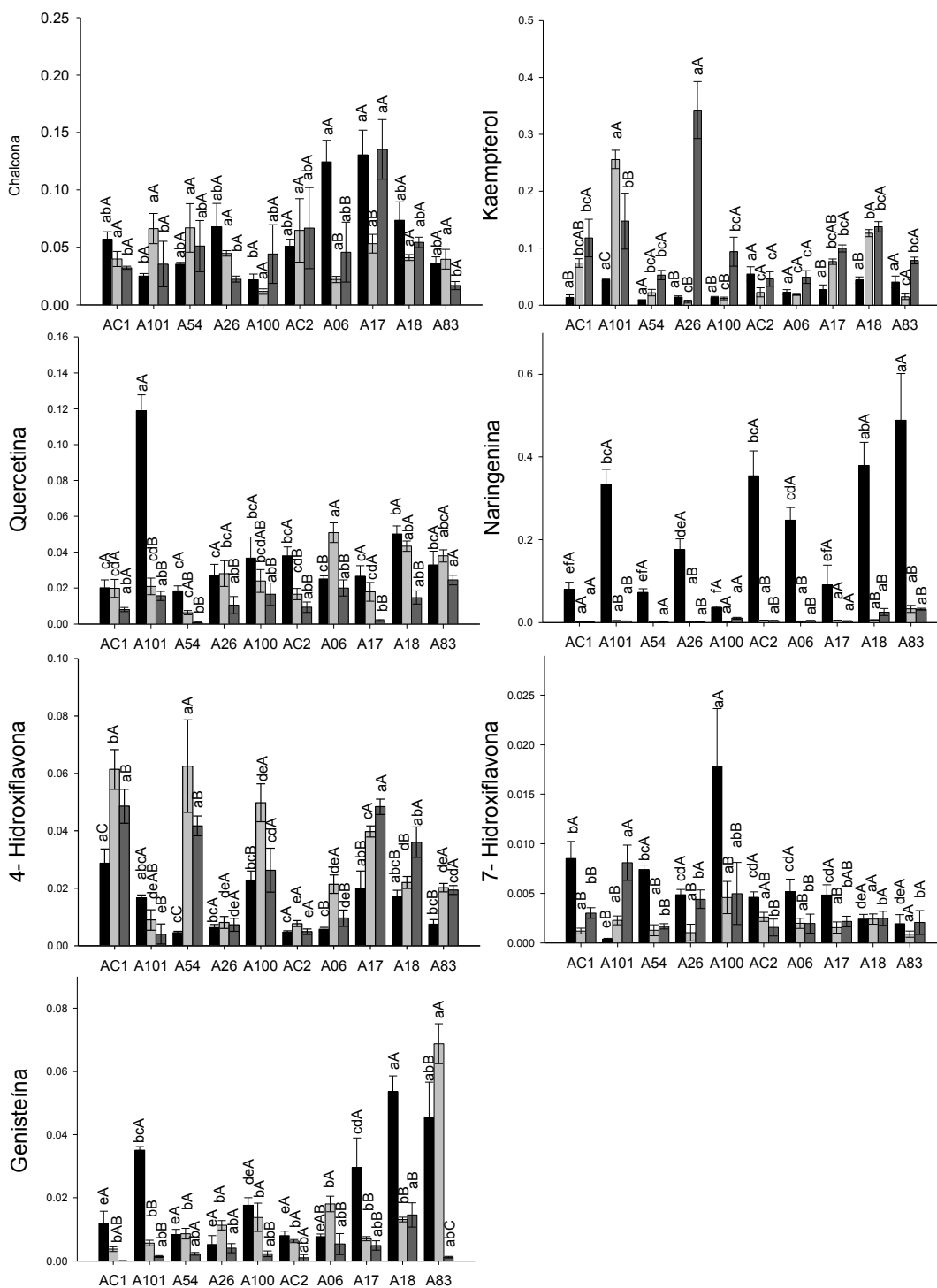


Figura 5 – Flavonóides em frutos de 10 acessos de *C. chinense* coletados em três estádios de desenvolvimento. Barras representam médias \pm erro padrão (n=6). Barras pretas, cinza claro e cinza escuro representam 20, 45 e 60 DAA respectivamente. Os valores são representados em mg.g⁻¹MS. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo e letras minúsculas diferenças

estatísticas entre os acessos, dados submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Ácidos Fenólicos

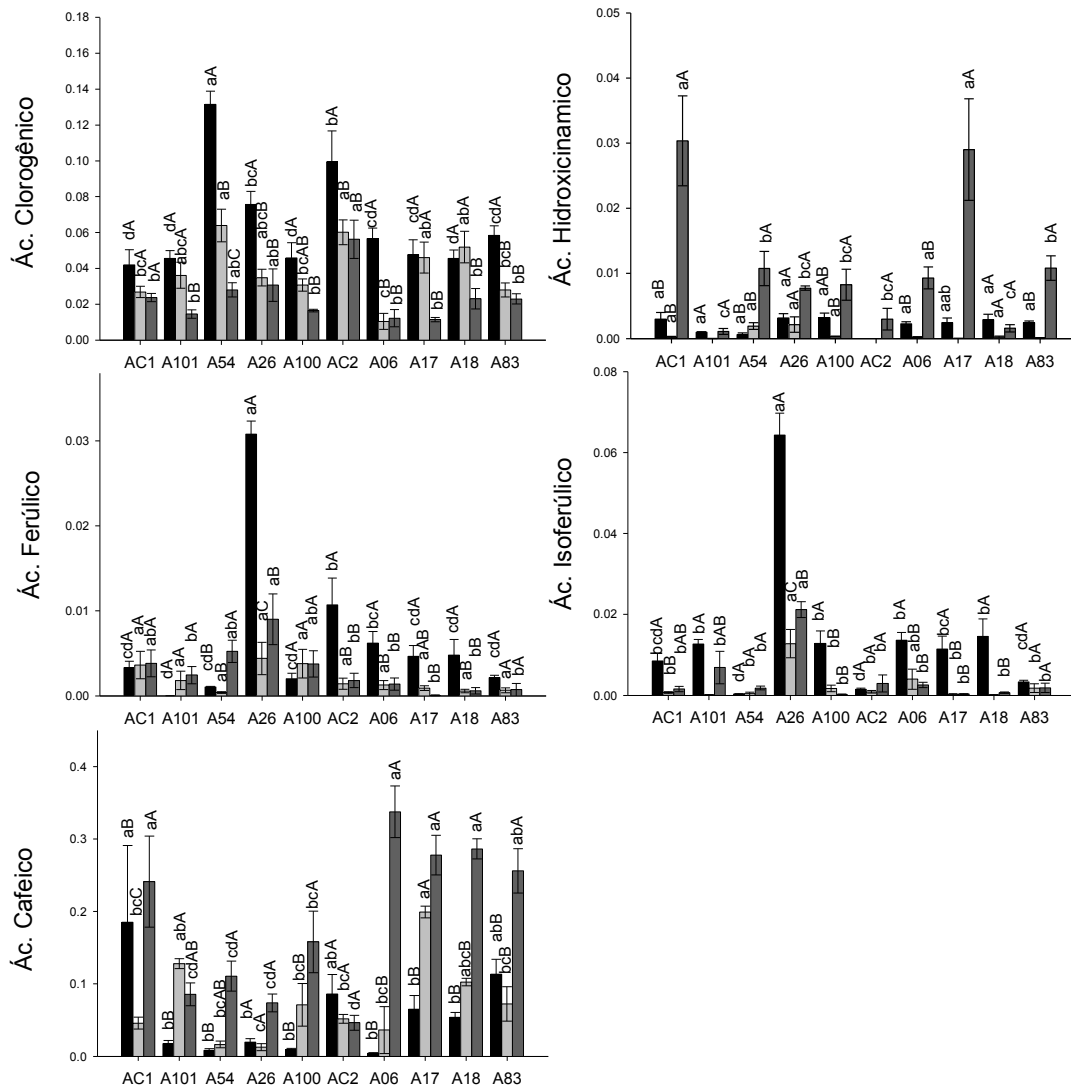


Figura 6 – Ácidos fenólicos em frutos de 10 acessos de *C. chinense* coletados em três estádios de desenvolvimento. Barras representam médias \pm erro padrão (n=6). Barras pretas, cinza claro e cinza escuro representam 20, 45 e 60 DAA respectivamente. Os valores são representados em mg.g⁻¹MS. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo e letras minúsculas diferenças estatísticas entre os acessos, dados submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Metabólitos secundários

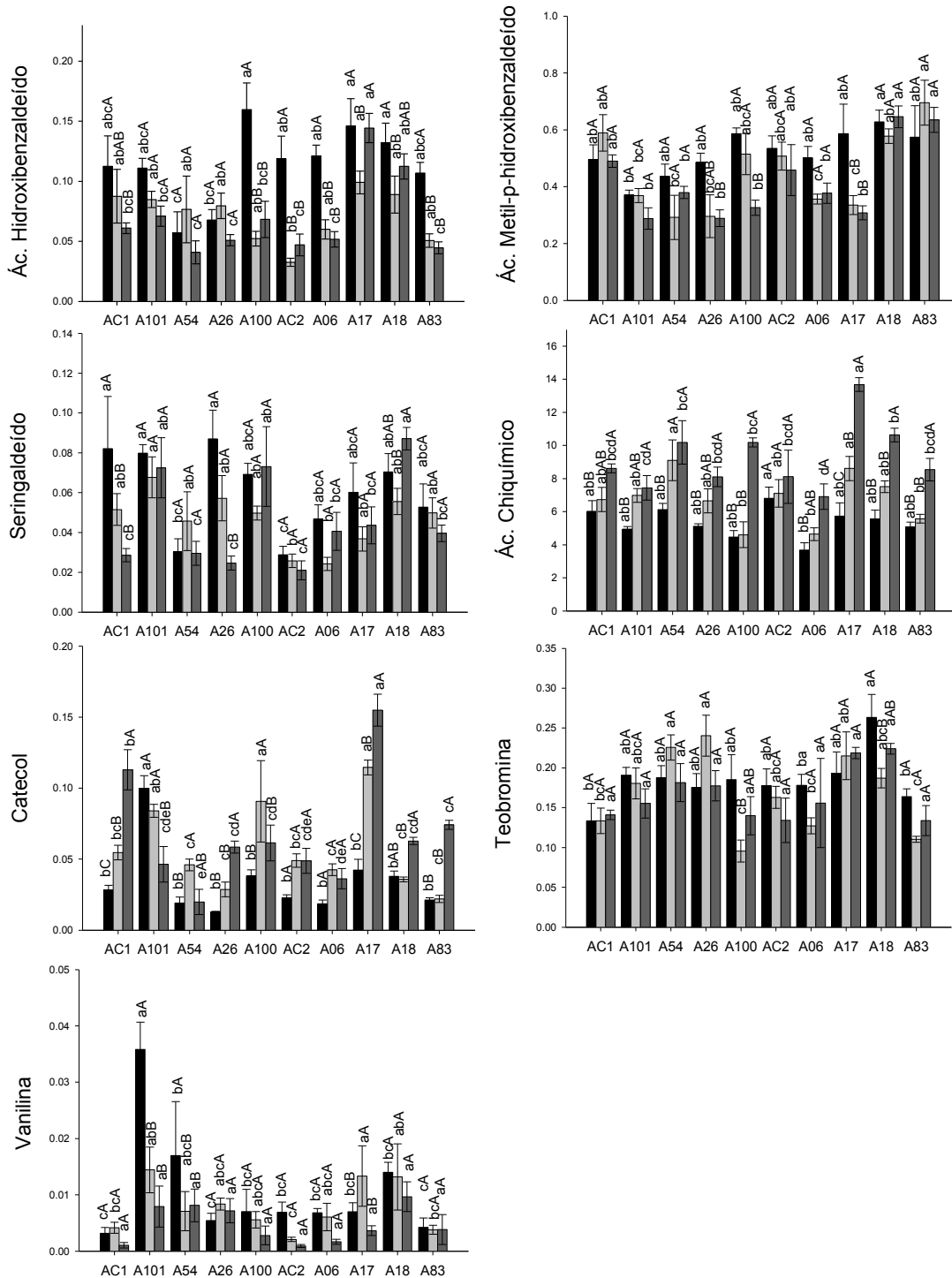


Figura 7 – Outros metabólitos secundários em frutos de 10 acessos de *C. chinense* coletados em três estádios de desenvolvimento. Barras representam médias \pm erro padrão (n=6). Barras pretas, cinza claro e cinza escuro representam 20, 45 e 60 DAA respectivamente. Os valores são representados em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas ao longo do tempo e

letras minúsculas diferenças estatísticas entre os acessos, dados submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de outros metabólitos do metabolismo secundário como hidroxibenzaldeído e metil- p- hidroxibenzaldeído indicam que estes compostos diminuem ao longo do tempo. Entretanto não foram observadas diferenças pronunciadas para os dois compostos (Figura 7). De uma maneira geral observa-se que frutos com baixos teores de capsaicinóides tendem a apresentar maiores quantidades desses benzaldeídos aos 20 DAA.

A xantina teobromina não variou ao longo do desenvolvimento, entretanto pequenas diferenças entre os acessos foram observadas. Verificou-se que os acessos 18 e 83 apresentaram o maior e menor teor em 60 DAA respectivamente. Seringaldeído e catecol se comportaram opostamente, o conteúdo de seringaldeído reduziu ao longo do tempo e os teores de catecol aumentaram. Esse comportamento foi claramente observado em frutos não picantes, com exceção para o acesso 18 que apresentou um acréscimo significativo de seringaldeído aos 60 DAA. O acesso 17 apresentou o maior teor de catecol aos 60 DAA (Figura 7).

O ácido chiquímico e vanilina, importantes precursores da rota de biossíntese de capsaicinóides, apresentaram comportamento oposto, os teores de ácido chiquímico aumentaram ao longo do tempo, enquanto vanilina reduziu (Figura 7). A análise individual de acessos picantes e não picantes não demonstram um padrão diferenciado para esses dois compostos, entretanto é sabido que estes participam de outras rotas biossintéticas e podem ser diferencialmente demandadas. Nota-se que ao longo do desenvolvimento os teores de ácido chiquímico aumentaram enquanto a maioria dos compostos secundários aqui quantificados apresentou redução ao longo do amadurecimento do fruto.

3.4 Correlações observadas entre os metabólitos avaliados nos três estádios de desenvolvimento

Com o intuito de verificar as possíveis inter-relações entre as variáveis aqui quantificadas, realizou-se uma análise de correlação de Pearson nos três estádios de desenvolvimento, 20, 45 e 60 DAA (Figura 6). Para uma melhor visualização das correlações entre os teores de capsaicinóides, TSS e percentual de matéria seca com outros metabólitos avaliados, as correlações observadas estão apresentadas em um mapa de cores (Figura 7).

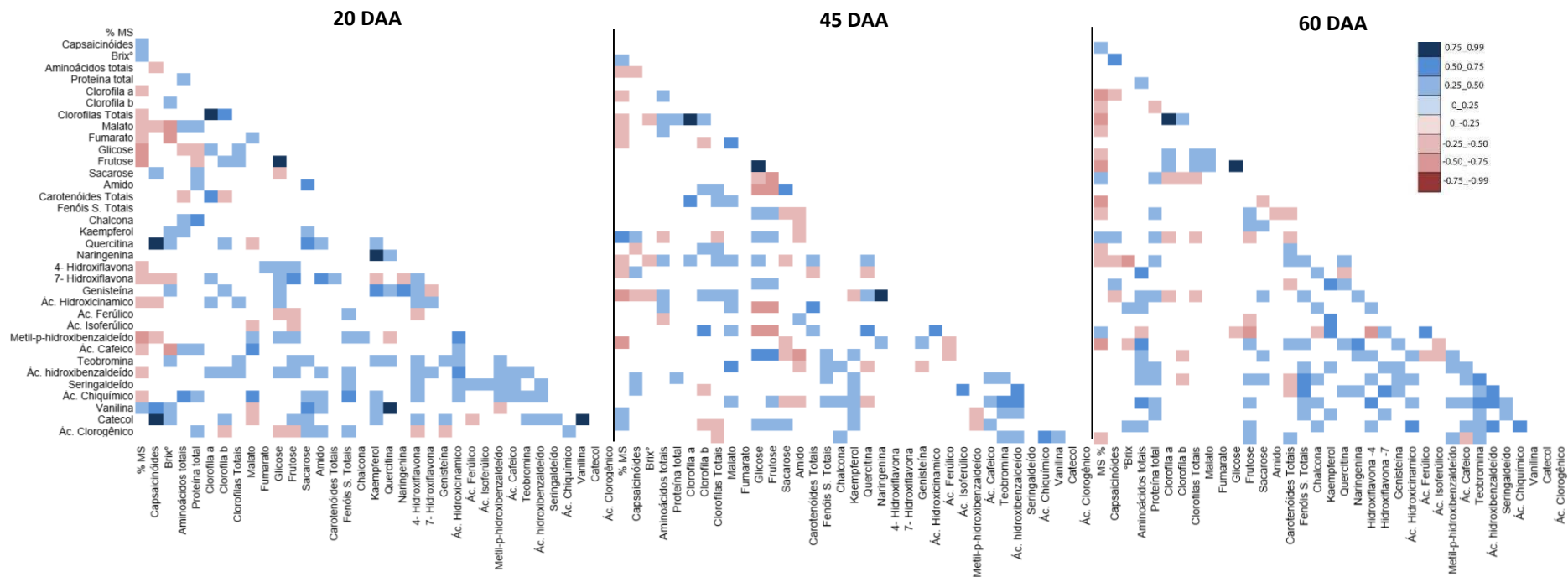


Figura 6 – Análise de correlação de Pearson das 35 variáveis avaliadas em frutos de *C. chinense* aos 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). Correlações significativas em cores ($P \leq 0.05$); Quadrados azuis e vermelhos representam correlações positivas e negativas respectivamente.



Figura 7 – Análise de correlação de Pearson entre capsaicinóides, sólidos solúveis totais (Brix°) e percentual de matéria seca (%MS) e variáveis avaliadas em frutos de *C. chinense* aos 20, 45 e 60 dias após a antese (DAA). Correlações significativas em cores ($P \leq 0.05$); Quadrados azuis e vermelhos representam correlações positivas e negativas respectivamente.

Entre as 179 correlações significativas entre as variáveis obtidas de frutos aos 20DAA, 132 foram positivas e 47 negativas. Foram observadas correlações já esperadas como, correlação positiva entre o percentual de matéria seca do fruto e o teor de sólidos solúveis, ácido chiquímico e outros compostos secundários, glicose e frutose, matéria seca e glicose e frutose e algumas relações entre flavonóides (Figura 6). Entretanto, algumas correlações inesperadas foram também observadas como capsaicinóides correlacionando com percentual de matéria seca, aminoácidos totais, níveis de sacarose e de malato e também entre Brix° e metabólitos secundários, malato, fumarato e clorofila b (Figura 7).

Analisando as correlações entre as variáveis obtidas em frutos aos 45 DAA observou-se 141 correlações significativas (Figura 6). Entre as correlações observadas 89 foram positivas e 52 negativas. O número de correlações entre capsaicinóides e TSS com outros compostos foi menor (Figura 7). Entretanto os flavonóides se correlacionam com capsaicinóides e TSS nesse estágio. Semelhante ao observado aos 20DAA foram encontradas correlações entre o ácido chiquímico e alguns metabolitos secundários e percentual de matéria seca e ácidos orgânicos. Além disso, glicose e frutose parecem estar altamente relacionadas com o metabolismo secundário, por apresentarem correlações

semelhantes ao estágio de 20DAA, no qual esses açúcares se correlacionam positivamente com flavonoides e negativamente com ácidos fenólicos. (Figura 6).

Entre as variáveis analisadas em frutos aos 60 DAA, foram observadas 162 correlações significativas, entre elas 116 positivas e 46 negativas (Figura 6). Para essa idade foi possível observar que correlações interessantes entre capsaicinóides, TSS e flavonóides permaneceram ao longo do desenvolvimento. Estes resultados sugerem a existência de interações entre estes compostos na determinação dos fenótipos observados. Interessantemente os capsaicinóides mantiveram uma correlação positiva com o percentual de matéria seca. Além disso, os capsaicinóides mantiveram correlações com os flavonóides quantificados e apresentaram uma alta correlação positiva com os teores de sólidos solúveis (Figura7).

O percentual de matéria seca durante todos os estádios de desenvolvimento dos frutos apresentou correlações negativas com o conteúdo de clorofilas, flavonóides, malato e fumarato. O ácido chiquímico por ser o precursor mediato da maioria dos compostos secundários, correlacionou-se com a maioria deles inclusive com os fenóis solúveis totais (Figura 6). Aparentemente os flavonóides e outros compostos secundários específicos como catecol, parecem estar relacionados com o teor de sólidos solúveis .

3.5 Análises multivariadas

Devido à amplitude de dados gerados nesse experimento, foram necessárias análises multivariadas para simplificar a estrutura dos dados e facilitar a visualização geral através da formação de grupos a partir dos dados obtidos de análise de frutos dos 10 acessos nos três estádios de desenvolvimento. Por meio do método de otimização de Tocher modificado, utilizando uma matrix de dissimilaridade obtida pela distância de Mahalanobis, foi possível projetar em um gráfico de três dimensões os grupos formados (Figura 8). Em adição, um segundo método de agrupamento hierárquico com base na matrix de distâncias de Mahalanobis (UPGMA, Mojena 1997) foi realizado para verificar se os agrupamentos obtidos pelo método de Tocher se repetem (Figura 9). Para obter a consistência dos grupos formados por esses métodos, foi realizada uma análise discriminante de Anderson para o método de Tocher modificado e uma verificação da correlação cofenética para o método hierárquico UPGMA.

O agrupamento pelo método de otimização de Tocher foi capaz de separar os 10 acessos em três grupos (Figura 8). O primeiro e maior grupo contém principalmente os acessos não picantes (Ac2, A06, A17, A18). Interessantemente este grupo também incluiu o acesso 54 que possui elevados teores de capsaicinóides. O segundo grupo incluiu acessos com elevados teores de capsaicinóides. Finalmente o grupo três, constituído pelo acesso que possui baixos teores de capsaicinóides e os menores valores de percentual de massa seca. A matrix de distâncias de Mahalanobis leva em consideração a influência global de todas variáveis, diferentemente de métodos como componentes principais e variáveis canônicas que geralmente apresentam maior contribuição na separação dos grupos os primeiro componentes. O teor de capsaicinóides contribuiu com 11% da variação, sendo a maior contribuição entre as variáveis. A porcentagem restante está distribuída para as demais variáveis. Através da análise de discriminante de Anderson, foi anotada uma taxa de erro de 60% para o método de otimização de Tocher modificado. O que remete a uma dificuldade em separar os diferentes acessos estudados.

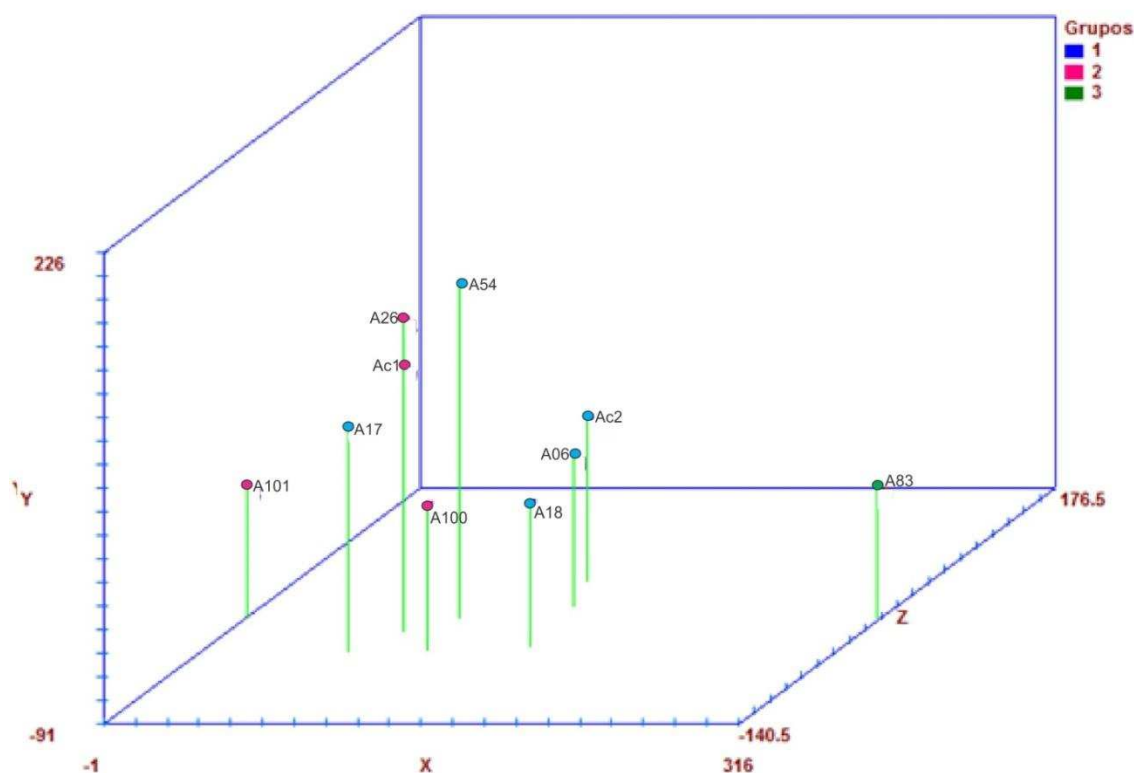


Figura 8 – Projeção 3D do agrupamento obtido pelo método de otimização de Tocher modificado, utilizando a matrix de dissimilaridade obtida pela distância de Mahalanobis. Grupo 1: (A06), (A17), (A18), (A54) e (Ac2); Grupo 2: (A26), (Ac1), (A101) e (A100); Grupo 3: (A83).

Analisando o agrupamento pelo método UPGMA, nota-se a formação de quatro grupos que correspondem aos grupos formados pela otimização de Tocher. Os grupos dois e três incluem os acessos picantes, enquanto o grupo um e quatro incluem os não picantes. Embora o agrupamento tenha sido semelhante os acessos 54 e 100 mudaram de posição, o acesso 54 está agrupado com o acesso Ac1, enquanto que o acesso 100 está agrupado com os acessos não picantes (Figura 9).

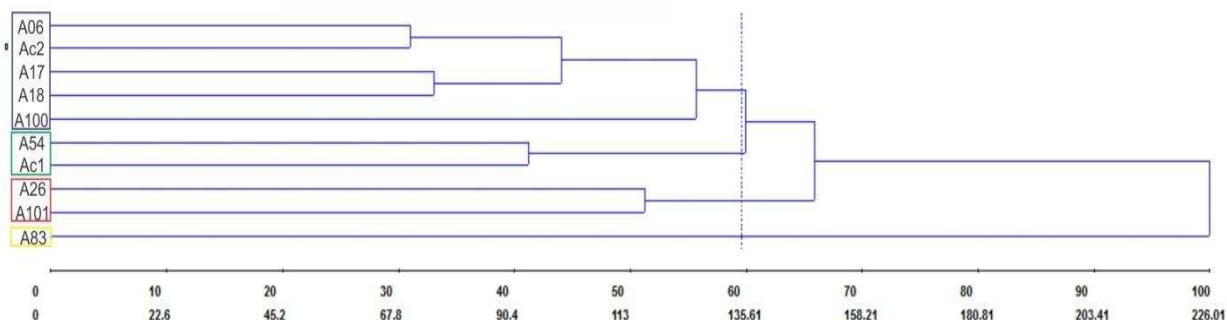


Figura 9 – Agrupamento hierárquico (UPGMA) utilizando a matrix de distâncias de Mahalanobis. Linha vertical tracejada representa o corte estatístico de acordo com (CRUZ, 2006). Grupo 1: (A06), (A17), (A18), (A100) e (Ac2); Grupo 2: (A54) e (Ac1); Grupo 3: (A26) e (A101); Grupo 4: (A83).

4 DISCUSSÃO

As plantas apresentam uma grande diversidade fenotípica, e isso está presente mesmo em populações de acessos da mesma espécie. Essa diversidade reflete fenótipos variados naturalmente e frequentemente são características quantitativas que são influenciadas por uma interação da genética e ambiente (Keurentjes & Sulpice, 2009). Adicionalmente, a variação natural pode ser utilizada para detectar correlações entre parâmetros metabólicos, fornecendo informações a respeito da regulação de vias importantes (Cross et al., 2006; Rosado-Souza et al., 2015). Entretanto o estudo do metabolismo em frutos utilizando populações naturais ainda é escasso. Até o momento não há estudos que demonstrem o comportamento temporal do metabolismo primário e secundário e suas correlações com característica de interesse econômico. Este estudo investigou os parâmetros metabólicos de acessos contrastantes de uma população natural e suas interações com características de interesse econômico, além disso, verificou-se o

comportamento desses metabólitos ao longo do desenvolvimento dos frutos. Cultivando estes acessos foi possível observar que em um mesmo ambiente, a composição bioquímica é variada.

Os metabólitos diretamente relacionados com o metabolismo do nitrogênio apresentaram comportamento semelhante entre os acessos. Com o amadurecimento dos frutos ocorre degradação de clorofilas e consecutiva biossíntese de carotenóides, acompanhado da transformação de cloroplastos em cromoplastos (Bouvier et al., 1998; Estrada et al., 2000), que pode estar relacionado ao aumento no conteúdo de aminoácidos. Entretanto em alguns casos, os frutos apresentaram amadurecimento tardio, com cloroplastos ainda em atividade e teores de clorofila ainda mantidos, o conteúdo de amido dos acessos 06, Ac1 e 26 continuou aumentando até 45 DAA. Obviamente o conteúdo de carotenóides nesses acessos teve um incremento acentuado apenas aos 60 DAA. Embora os metabólitos secundários quantificados apresentaram uma grande variação, os teores de fenóis solúveis totais não sofreram alterações ao longo do desenvolvimento. Tem-se observado que a biossíntese de amido ocorre nos estádios iniciais do desenvolvimento, e com o amadurecimento do fruto essa biossíntese diminui e genes relacionados com a degradação de sacarose aumentam sua expressão (Nielsen et al., 1991; Beckles et al., 2011; Osorio et al., 2012). Este fato justifica os reduzidos teores de glicose e frutose até 45 DAA e maiores teores em 60 DAA nos acessos que apresentaram amadurecimento tardio. Embora o amido não contribua diretamente para o aumento dos sólidos solúveis no pericarpo, o maior acúmulo deste em estádios iniciais do desenvolvimento pode indicar um incremento no teor de sólidos solúveis em estádios mais avançados contribuindo com o pool de hexoses, semelhante ao que ocorre em tomate (Beckles et al., 2011; Centeno et al., 2011; Osorio et al., 2012). Como esperado os conteúdos de glicose e frutose aumentaram ao longo do desenvolvimento, e a sacarose aumentou até 45 DAA, mas este conteúdo reduziu aos 60 DAA. Além disso, os teores de amido reduziram drasticamente aos 60 DAA, indicando que o metabolismo de glicose, frutose e sacarose em frutos não climatéricos é semelhante ao de frutos climatéricos (Beckles et al., 2011).

Analisando os ácidos orgânicos aqui quantificados, observamos que os níveis de fumarato são muito inferiores comparados ao malato, entretanto em todos os acessos estes reduziram ao longo do desenvolvimento. Fumarato apresentou um pequeno incremento aos 45 DAA, mas não foi detectado aos 60 DAA. Essa forte alteração durante o

amadurecimento sugere uma grande demanda por compostos com esqueletos de carbono e uma regulação a nível transcricional, semelhante a frutos climatéricos (Osorio et al., 2012).

Diante da grande variação em relação aos metabólitos secundários quantificados, podemos perceber que há uma alta diversidade fenotípica, como a descrita em Wahyuni et al. (2011). Embora os acessos analisados pertençam à mesma espécie, grande variabilidade em flavonóides e outros polifenóis foi observada. Logo, estes são candidatos interessantes que podem ser utilizados em programas de melhoramento visando variedades de pimentas com altos teores de flavonoides, uma vez que a variação fenotípica entre indivíduos proporciona maior amplitude de estudos para identificarem fatores genéticos e metabólicos responsáveis por tais características.

Aminoácidos de cadeia ramificada estão sendo discutidos como importantes para a biossíntese de capsacinóides. A biossíntese destes aminoácidos em frutos com altos teores de capsacinóides parece ser mais ativa para suprir a demanda de precursores para a biossíntese (Mazourek et al., 2009). Interessantemente o conteúdo de aminoácidos totais se correlacionou negativamente com o teor de capsacinóides aos 20 e 45 DAA, no qual ocorre a biossíntese e acúmulo destes alcalóides. Porém, além da demanda por compostos nitrogenados, há necessidade de esqueletos de carbono para suprir a biossíntese de fenilalanina a partir da rota do ácido chiquímico, o que pode justificar a correlação positiva entre capsacinóides e sacarose aos 20 DAA, que neste estágio é translocada para o fruto (Beckles et al., 2011). Em adição, o grande número de correlações entre capsacinóides e metabólitos secundários em todos os estádios de desenvolvimento, salienta um complexo balanço entre biossíntese e degradação destes compostos para suprir demandas metabólicas, proporcionado por um compartilhamento de intermediários em comum, em especial os fenilpropanóides (Hall et al., 1987; Materska et al., 2003; Mazourek et al., 2009). Esse balanço fica mais evidente, ao observamos as fortes correlações positivas entre os capsacinóides e vanilina, o segundo precursor imediato da rota de biossíntese de capsacinóides e catecol, composto relacionado com a degradação de compostos aromáticos.

O teor de sólidos solúveis apresentou uma forte correlação positiva com os teores de capsacinóides aos 60 DAA. Há estudos que demonstram a degradação dos capsacinóides através da atividade de peroxidases (Bernal & Barceló, 1996), no qual geram compostos como 5,5'-dicapsaicina e 4'-O-5-dicapsaicina éter. Estes compostos gerados podem estar

relacionados com o TSS. Entretanto, mais estudos são necessários para entender essa correlação. Diante de várias correlações positivas e negativas entre o TSS e os metabólitos secundários, em especial os flavonóides, sugere-se que além da contribuição de açúcares e ácidos orgânicos no TSS, a importância de flavonóides e ácidos fenólicos para determinação do TSS também deve ser considerada, gerando informações para posteriores estudos.

Os ácidos orgânicos malato e fumarato se comportaram de forma diferente entre si, essa diferença pode ser em função dos diferentes papéis que esses ácidos desempenham nos frutos de *C. chinense*. Os ácidos orgânicos desempenham diversas funções no metabolismo celular vegetal e o acúmulo dos mesmos é altamente diversificado entre espécies (Araújo et al., 2011). Recentemente observou-se em *C. chinense* que os níveis de fumarato em folhas correlacionam positivamente com a matéria seca de frutos (Rosado-Souza et al., 2015). Entretanto, em nosso trabalho o fumarato em frutos apresentou correlação negativa com o percentual de matéria seca do mesmo órgão. Isso demonstra a importância do fumarato durante o desenvolvimento de frutos de *C. chinense* e as diferentes relações deste composto com tecidos específicos. Em frutos jovens (20 DAA) o malato correlacionou negativamente com o percentual de matéria seca, capsaicinóides e TSS (Figura 7). Essa relação do malato com o teor de capsaicinóides aos 20 DAA possivelmente está associada ao direcionamento de derivados do piruvato para a rota de biossíntese de capsaicinóides. A relação com o conteúdo de matéria seca possivelmente é explicada por relações com o TSS. Recentemente o malato foi sugerido como importante para o metabolismo do amido transitório em frutos de tomates (Centeno et al., 2011). Isso sugere que o acúmulo de amido aos 20 DAA é influenciado pelos teores de malato também em *C. chinense*, o qual uma vez degradado forneceu hexoses que contribuem para o incremento no TSS. Uma vez que os níveis de malato se correlacionam com o percentual de matéria seca em todos os estádios, sua importância para o acúmulo de TSS e matéria seca nos frutos de *C. chinense* parece ser relevante. Além disso, malato e fumarato se correlacionaram positivamente e negativamente nos estádios de 20 e 45 DAA com diversos metabólitos secundários, assim possivelmente influenciando o metabolismo secundário através da alteração do pH e como precursores da biossíntese (Kader, 2008; Flores et al., 2012).

No presente estudo, os capsaicinóides foram os únicos metabólitos capazes de distinguir os acessos quimicamente. A justificativa para um agrupamento adensado são as

pequenas diferenças genéticas apresentadas pelos acessos estudados que se traduz em uma alta dissimilaridade fenotípica, na qual as 35 variáveis quantificadas não obtiveram respostas padronizadas entre os acessos, ou seja, as mesmas não foram capazes de separar linearmente os acessos estudados. Isso está de acordo com a literatura sugerindo que populações naturais são ótimos recursos para estudos de diversidade fenotípica (Mitchell-Olds & Schmitt, 2006; Trontin et al., 2011), e que podem fornecer informações importantes para os programas de melhoramento de plantas.

5 CONCLUSÕES

Como conclusão deste trabalho, sugere-se que o metabolismo de glicose, frutose e sacarose em frutos de *C. chinense*, conhecidos como não-climatéricos, seja semelhante ao de frutos de tomate, climatéricos. Como foi observado um elevado número de correlações entre capsaicinóides e metabólitos secundários, concluiu-se que há uma complexa relação entre biossíntese e degradação de ácidos fenólicos, flavonóides e fenilpropanóides, determinando os níveis de capsaicinóides em estádios iniciais do desenvolvimento. Além disso, esses compostos parecem influenciar na determinação do teor de sólidos solúveis em frutos de *C. chinense*. Os dados aqui apresentados sugerem o malato e fumarato como importantes metabólitos envolvidos na regulação do desenvolvimento de frutos de *C. chinense*. Sugere-se também que o malato esteja relacionado com os níveis de capsaicinóides em frutos jovens.

6 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L., NUNES-NESE, A. & FERNIE, A. R. (2011). **Fumarate: multiple functions of a simple metabolite**. *Phytochemistry* 72, 838-843.

AZA-GONZALEZ, C., NUNEZ-PALENIUS, H. G. & OCHOA-ALEJO, N. (2011). **Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.)**. *Plant cell reports* 30, 695-706.

BAXTER, C. J., CARRARI, F., BAUKE, A., OVERY, S., HILL, S. A., QUICK, P. W., FERNIE, A. R. & SWEETLOVE, L. J. (2005). **Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids**. *Plant and Cell Physiology* 46, 425-437.

BECKLES, D. M., HONG, N., STAMOVA, L. & LUENGWILAI, K. (2011). **Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review**. *Fruits* 67, 49-64.

BENNETT, D. J. & KIRBY, G. W. (1968). **Constitution and biosynthesis of capsaicin**. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 442-446.

BERNAL, M. A. & BARCELÓ, A. R. (1996). **5, 5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper**. *Journal of agricultural and food chemistry* 44, 3085-3089.

BOUVIER, F., BACKHAUS, R. A. & CAMARA, B. (1998). **Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress**. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30651-30659.

BRODERICK, C. & COOKE, P. (2007). **Fruit composition, tissues, and localization of antioxidants and capsaicinoids in *Capsicum* peppers by fluorescence microscopy**. In II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables: FAVHEALTH 2007 841, pp. 85-90.

CATERINA, M. J., LEFFLER, A., MALMBERG, A. B., MARTIN, W. J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K. R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A. I. & JULIUS, D. (2000). **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor**. *Science* 288, 306-313.

CENTENO, D. C., OSORIO, S., NUNES-NESE, A. & other authors (2011). **Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening**. *The Plant cell* 23, 162-184.

CONTRERAS-PADILLA, M. & YAHIA, E. M. (1998). **Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity.** Journal of agricultural and food chemistry 46, 2075-2079.

CROSS, J. M., VON KORFF, M., ALTMANN, T., BARTZETKO, L., SULPICE, R., GIBON, Y., PALACIOS, N. & STITT, M. (2006). **Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions.** Plant physiology 142, 1574-1588.

CRUZ, C. (2006). **GENES-Programa Genes: Biometria: 382 pp.** Editora UFV Viçosa (MG).

DAOOD, H., ILLÉS, V., GNAYFEED, M., MÉSZÁROS, B., HORVÁTH, G. & BIACS, P. (2002). **Extraction of pungent spice paprika by supercritical carbon dioxide and subcritical propane.** The Journal of supercritical fluids 23, 143-152.

EDGE, R., MCGARVEY, D. & TRUSCOTT, T. (1997). **The carotenoids as anti-oxidants—a review.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 41, 189-200.

ESTRADA, B., BERNAL, M. A., DÍAZ, J., POMAR, F. & MERINO, F. (2000). **Fruit Development in Capsicum annuum: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns.** Journal of agricultural and food chemistry 48, 6234-6239.

FERNIE, A. R., ROSCHER, A., RATCLIFFE, R. G. & KRUGER, N. J. (2001). **Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells.** Planta 212, 250-263.

FINGER, F., LANNES, S., SCHUELTER, A., DOEGE, J., COMERLATO, A., GONCALVES, L., FERREIRA, F., CLOVIS, L. & SCAPIM, C. (2010). **Genetic diversity of Capsicum chinensis (Solanaceae) accessions based on molecular markers and morphological and agronomic traits.** Genetics and molecular research: GMR, 1852-1864.

FLORES, P., HELLÍN, P. & FENOLL, J. (2012). **Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry.** Food chemistry 132, 1049-1054.

GIBON, Y., BLAESING, O. E., HANNEMANN, J. & other authors (2004). **A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness.** The Plant cell 16, 3304-3325.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S., GARCÉS-CLAVER, A., MALLOR, C., DE MIERA, L. E. S., FAYOS, O., POMAR, F., MERINO, F. & SILVAR, C. (2014). **New Insights into Capsicum spp Relatedness and the Diversification Process of Capsicum annum in Spain.** PloS one 9, e116276.

HAAK, D. C., MCGINNIS, L. A., LEVEY, D. J. & TEWKSBURY, J. J. (2011). **Why are not all chillies hot? A trade-off limits pungency.** Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, rspb20112091.

HALL, R. D., HOLDEN, M. A. & YEOMAN, M. M. (1987). **The accumulation of phenylpropanoid and capsaicinoid compounds in cell cultures and whole fruit of the chilli pepper, Capsicum frutescens Mill.** Plant cell, tissue and organ culture 8, 163-176.

HELYES, L., PÉK, Z. & LUGASI, A. (2006). **Tomato fruit quality and content depend on stage of maturity.** HortScience 41, 1400-1401.

HOWARD, L. R. & WILDMAN, R. E. (2007). **Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (Capsicum annum).** Nutraceuticals.

HUGUENEY, P., BADILLO, A., CHEN, H. C., KLEIN, A., HIRSCHBERG, J., CAMARA, B. & KUNTZ, M. (1995). **Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in Capsicum annum chromoplasts.** The Plant journal : for cell and molecular biology 8, 417-424.

INCE, A. G., KARACA, M. & ONUS, A. N. (2009). **Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for Capsicum accessions.** Genetic resources and crop evolution 56, 211-221.

KADER, A. A. (2008). **Flavor quality of fruits and vegetables.** Journal of the science of food and agriculture 88, 1863-1868.

KEINÄNEN, M., OLDHAM, N. J. & BALDWIN, I. T. (2001). **Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in Nicotiana attenuata.** Journal of agricultural and food chemistry 49, 3553-3558.

KEURENTJES, J. J. & SULPICE, R. (2009). **The role of natural variation in dissecting genetic regulation of primary metabolism.** Plant signaling & behavior 4, 244-246.

KIM, S., PARK, M., YEOM, S. I. & other authors (2014). **Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in Capsicum species.** Nature genetics 46, 270-278.

LANNES, S. D., FINGER, F. L., SCHUELTER, A. R. & CASALI, V. W. (2007a). **Growth and quality of Brazilian accessions of Capsicum chinense fruits**. *Scientia Horticulturae* 112, 266-270.

LANNES, S. D., FINGER, F. L., SCHUELTER, A. R. & CASALI, V. W. D. (2007b). **Growth and quality of Brazilian accessions of Capsicum chinense fruits**. *Scientia Horticulturae* 112, 266-270.

LEE, R. J., YOLTON, R. L., YOLTON, D. P., SCHNIDER, C. & JANIN, M. L. (1996). **Personal defense sprays: effects and management of exposure**. *Journal of the American Optometric Association* 67, 548-560.

LEETE, E. & LOUDEN, M. C. L. (1968). **Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum frutescens**. *Journal of the American Chemical Society* 90, 6837-6841.

LIU, S., LI, W., WU, Y., CHEN, C. & LEI, J. (2013). **De novo transcriptome assembly in chili pepper (Capsicum frutescens) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids**. *PLoS one* 8, e48156.

LUO, X. J., PENG, J. & LI, Y. J. (2011). **Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids**. *European journal of pharmacology* 650, 1-7.

MAILLARD, M. N., GIAMPAOLI, P. & RICHARD, H. M. (1997). **Analysis of eleven capsaicinoids by reversed -phase high performance liquid chromatography**. *Flavour and fragrance journal* 12, 409-413.

MARTINEZ-LOPEZ, L. A., OCHOA-ALEJO, N. & MARTINEZ, O. (2014). **Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development**. *BMC genomics* 15, 143.

MATERSKA, M., PIACENTE, S., STOCHMAL, A., PIZZA, C., OLESZEK, W. & PERUCKA, I. (2003). **Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit Capsicum annuum L**. *Phytochemistry* 63, 893-898.

MAZOUREK, M., PUJAR, A., BOROVSKY, Y., PARAN, I., MUELLER, L. & JAHN, M. M. (2009). **A dynamic interface for capsaicinoid systems biology**. *Plant physiology* 150, 1806-1821.

MITCHELL-OLDS, T. & SCHMITT, J. (2006). **Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis**. *Nature* 441, 947-952.

NIELSEN, T. H., SKJÆRBÆ, H. C. & KARLSEN, P. (1991). **Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants.** *Physiologia Plantarum* 82, 311-319.

NUNES -NESI, A., CARRARI, F., GIBON, Y. & other authors (2007). **Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function.** *The Plant Journal* 50, 1093-1106.

OCHOA-ALEJO, N. & RAMÍREZ-MALAGÓN, R. (2001). **Invited review: in vitro chili pepper biotechnology.** *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37, 701-729.

ONUS, A. N. & PICKERSGILL, B. (2004). **Unilateral incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): occurrence and taxonomic distribution.** *Annals of botany* 94, 289-295.

OSORIO, S., ALBA, R., NIKOLOSKI, Z., KOCHVENKO, A., FERNIE, A. R. & GIOVANNONI, J. J. (2012). **Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior.** *Plant physiology* 159, 1713-1729.

PADAYATTY, S. J., KATZ, A., WANG, Y. & other authors (2003). **Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention.** *Journal of the American College of Nutrition* 22, 18-35.

PARAN, I. & VAN DER KNAAP, E. (2007). **Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper.** *Journal of experimental botany* 58, 3841-3852.

PICKERSGILL, B. (1971). **Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*).** *Evolution*, 683-691.

QIN, C., YU, C., SHEN, Y. & other authors (2014). **Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5135-5140.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (2000). ***Capsicum – Pimentas e Pimentões no Brasil.*** Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa Hortaliças Brasília, 113.

RODRIGUEZ, J., BERKE, T., ENGLE, L. & NIENHUIS, J. (1999). **Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers.** *Theoretical and Applied Genetics* 99, 147-156.

ROSADO-SOUZA, L., SCOSSA, F., CHAVES, I. S. & other authors (2015). **Exploring natural variation of photosynthetic, primary metabolism and growth parameters in a large panel of *Capsicum chinense* accessions.** *Planta*.

SCHAFFER, A. A. & PETREIKOV, M. (1997). **Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation.** *Plant physiology* 113, 739-746.

SCHULZECK, S. & WULF, H. (1997). **Local therapy with capsaicin or ASS in chronic pain.** *Der Schmerz* 11, 345-352.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., L.A., M. & PETROVICK, P. R. (2004). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 1102.

STEWART, C., KANG, B. C., LIU, K., MAZOUREK, M., MOORE, S. L., YOO, E. Y., KIM, B. D., PARAN, I. & JAHN, M. M. (2005a). **The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase.** *The Plant Journal* 42, 675-688.

STEWART, C., MAZOUREK, M., STELLARI, G. M., O'CONNELL, M. & JAHN, M. (2007). **Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus.** *Journal of experimental botany* 58, 979-991.

STEWART, C., JR., KANG, B. C., LIU, K., MAZOUREK, M., MOORE, S. L., YOO, E. Y., KIM, B. D., PARAN, I. & JAHN, M. M. (2005b). **The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42, 675-688.

SUN, T., XU, Z., WU, C. T., JANES, M., PRINYAWIWATKUL, W. & NO, H. K. (2007). **Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.).** *Journal of food science* 72, S98-S102.

TEWKSBUURY, J. J. & NABHAN, G. P. (2001). **Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chilies.** *Nature* 412, 403-404.

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

TRONTIN, C., TISNÉ, S., BACH, L. & LOUDET, O. (2011). **What does *Arabidopsis* natural variation teach us (and does not teach us) about adaptation in plants?** *Current opinion in plant biology* 14, 225-231.

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

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A. R., SUDARMONOWATI, E., BINO, R. J. & BOVY, A. G. (2013a). **Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet.** *Journal of natural products* 76, 783-793.

WAHYUNI, Y., BALLESTER, A. R., TIKUNOV, Y., DE VOS, R. C., PELGROM, K. T., MAHARIJAYA, A., SUDARMONOWATI, E., BINO, R. J. & BOVY, A. G. (2013b). **Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity.** *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 9, 130-144.

WELLBURN, A. R. (1994). **The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.** *Journal of plant physiology* 144, 307-313.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 - Quadro de análises de variância (ANOVA) de 35 variáveis avaliadas em 10 acessos de *C. chinense*. Delineamento inteiramente casualizado, seis replicatas para cada acesso. Abreviações: Caps, capsaicinóides; TSS, teor de sólidos solúveis(Brix^o); Aas, aminoácidos totais; Pro T, proteína total; Chl a, clorofila a; Chl b, clorofila b; Chl total, clorofilas totais; Car T, carotenóides totais; Fe T, fenóis solúveis totais.

FV	GL	Quadrados Médios									
		% Massa seca	Caps.	TSS	AAs	Pro T	Malato	Fumarato	Glicose	Frutose	Sacarose
Acessos (A)	9	73,43**	1067598,7**	16,62**	184116,9**	1857,6**	637898,3**	300,10 ^{ns}	476599,75**	486475,3**	13338,9**
Tempos (T)	2	126,77**	961831,9**	236,60**	455121,1**	4456,5**	33725672,6**	26138,66**	2530415,53**	4703249,9**	175750,6**
AXT	18	13,40**	216909,2**	11,18**	36984,4**	1032,1*	632855,7**	1099,40**	147422,03**	87126,1**	12296,2**
Residuo (r)	150	2	10439,6	0,24	8985,1	580,9	29416,2	371,98	24499,02	24860,5	2272,0
Media		13,49	176,69	6,33	289,81	58,70	815,01	23,99	575,64	592,67	66,80
CV(%)		10,56	57,82	7,83	32,70	41,58	21,04	80,36	27,19	26,60	71,35

* significativo a 5%, ** significativo a 1% e ns não significativo segundo o teste F. CV(%) Coeficiente de variação; GL, Grau de liberdade.

FV	GL	Quadrados Médios										
		Amido	Chl a	Chl b	Chl totais	Car T	Fe T	Chalcona	Kaempferol	Quercitina	Naringenina	4-hidroxi flavona
Acessos (A)	9	5400,7**	0,52 ^{ns}	0,38**	1,14**	0,9427**	313,2**	0,009**	0,030**	0,002**	0,058**	0,004**
Tempos (T)	2	107783,8**	34,45*	4,70**	59,85**	2,92**	409,0**	0,004 ^{ns}	0,118**	0,011**	0,956**	0,005**
AXT	18	6810,3**	0,33 ^{ns}	0,36**	1,07**	0,67**	108,7**	0,004 ^{ns}	0,260**	0,001**	0,045**	0,0009**
Residuo (r)	150	1090,4	0,28	0,04	0,28	0,03	24,6	0,002	0,026	0,0001	0,004	0,00006
Media		48,61	1,11	0,46	1,52	0,40	27,58	5,22	6,99	2,60	8,01	2,32
CV(%)		67,93	48,0	43,65	35,28	46,19	18,00	98,74	73,65	44,61	87,92	32,33

* significativo a 5%, ** significativo a 1% e ns não significativo segundo o teste F. CV(%) Coeficiente de variação; GL, Grau de liberdade.

FV	GL	Quadrados Médios							
		7-hidroxiflavona	Genisteína	Ac. hidrodinâmico	Ac. ferúlico	Ác. isoferúlico	Metil-p-hidroxibenzaldeído	Ác. cafeico	Teobromina
Acessos (A)	9	0,00007**	0,002**	230,74**	282,02**	0,00028**	0,1722**	0,049**	0,020**
Tempos (T)	2	0,00022**	0,005**	1898,5**	351,95**	0,00035**	0,1512**	0,313**	0,004 ^{ns}
AXT	18	0,00091**	0,001**	210,4**	132,45**	0,00013**	0,3024**	0,285**	0,004**
Residuo (r)	150	0,0006	0,0006	13,16	8,98	0,00001	0,0143	0,003	0,002
Media		3,66	1,39	4,75	3,84	3,84	0,4719	0,10	0,17
CV(%)		54,62	56,09	101,30	77,97	47,50	25,40	54,25	28,95

* significativo a 5%, ** significativo a 1% e ns não significativo segundo o teste F. CV(%) Coeficiente de variação; GL, Grau de liberdade.

FV	GL	Quadrados Médios					
		Ác. hidroxibenzaldeído	Seringaldeído	Ác. chiquímico	Vanilina	Catecol	Ác. clorogênico
Acessos (A)	9	0,0091**	0,004**	26,05**	0,00048**	0,010**	0,0052
Tempos (T)	2	0,0370**	0,004**	232,05**	0,00054**	0,174**	0,0253
AXT	18	0,0031**	0,001**	7,78**	0,00015**	0,003**	0,0012
Residuo (r)	150	0,0009	0,0005	2,57	0,00004	0,0003	0,0002
Media		8,45	0,0051	7,11	7,83	0,0052	0,0042
CV(%)		36,45	43,63	22,53	75,82	36,76	37,43

* significativo a 5%, ** significativo a 1% e ns não significativo segundo o teste F. CV(%) Coeficiente de variação; GL, Grau de liberdade.