

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA
A SAÚDE

GABRIEL VIEIRA RAMOS

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE CUCURBITACINA B POR
CLAE-UV/DAD EM ABÓBORAS (*Cucurbita sp.*)

NITERÓI

2017

GABRIEL VIEIRA RAMOS

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE CUCURBITACINA B POR
CLAE-UV/DAD EM ABÓBORAS (*Cucurbita sp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos
para a Saúde da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal Fluminense.

Orientadora:

Prof^a Dra. Josiane Roberto Domingues

Co-orientadora:

Dra. Izabela Miranda de Castro

NITERÓI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

GABRIEL VIEIRA RAMOS

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA ANÁLISE DE CUCURBITACINA B POR CLAE-UV/DAD EM ABÓBORAS (*Cucurbita sp.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

Aprovado em 30 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



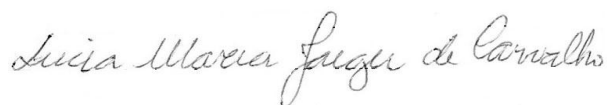
Profª Dra. Josiane Roberto Domingues

Faculdade de Farmácia (UFF)



Dra. Izabela Miranda de Castro

Embrapa Agroindústria de Alimentos



Profª Dra. Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Faculdade de Farmácia (UFRJ)



Profª Dra. Samanta Cardozo Mourão

Faculdade de Farmácia (UFF)

Niterói, 2017

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, Jaime e Regina Ramos

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que me protege de todos os males e me proporciona saúde e sorte na vida.

Aos meus pais, Jaime Vianna Ramos e Regina Celia Vieira Ramos, que me proporcionaram a vida, o sustento, o total apoio em todos os meus passos, moldaram a minha personalidade baseada nos bons costumes e me deram a inspiração para eu me tornar farmacêutico.

À minha orientadora, professora Josiane Roberto Domingues pela oportunidade cedida.

À minha co-orientadora, Dra. Izabela Miranda de Castro pela intensa dedicação e no auxílio das práticas, antes mesmo da escolha do tema.

À Embrapa unidade do Rio de Janeiro por permitir que eu utilizasse as instalações e equipamentos para o desenvolvimento do meu trabalho.

À professora Kátia Gomes de Lima Araújo por ter acreditado no meu potencial.

Resumo

Cucurbita moschata (abóbora sergipana), *C. maxima* (abóbora moranga) e Tetsukabuto (abóbora japonesa) são espécies vegetais pertencentes à família *Cucurbitaceae*, geralmente utilizadas como alimento, porém com propriedades nutracêuticas principalmente nas sementes. Algumas dessas propriedades terapêuticas se devem a presença de um grupo de substâncias denominadas cucurbitacinas. A cucurbitacina B – Cuc B – é um triterpeno que pode ser encontrado livre ou glicosilado e que vem sendo estudada quanto ao seu potencial farmacológico, mas ainda apresenta escassez de dados quanto à sua presença e concentrações nas diferentes espécies e partes dos frutos. As cascas, bagaços e sementes são alguns dos resíduos do processamento agroindustrial de frutas e hortaliças que são gerados em grande quantidade e subutilizados na alimentação humana e animal. O presente trabalho objetivou desenvolver um método de produção de farinhas de sementes, da polpa e da casca das abóboras das espécies *C. moschata*, *C. maxima* e do híbrido Tetsukabuto e avaliar a qualidade desse processo sob o ponto de vista da microbiota. Além disso, foi desenvolvido um método para a detecção de Cuc B em algumas farinhas dessas amostras baseado no método QuEChERS, utilizando etapas de extração (acetonitrila/água 70:30) e purificação (MgSO₄, C18 e alumina) seguido da quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por UV/DAD. Foi realizada também uma avaliação de Cuc B nas sementes de abóboras provenientes da Embrapa Tabuleiros Costeiros que tem genética conhecida. O método desenvolvido foi validado quanto à seletividade, linearidade (faixa de trabalho de 0,15 a 100,88 µg/mL), limites de detecção (instrumental: 0,120 µg/mL; na matriz avaliada: 0,602 µg/g), limites de quantificação (instrumental: 0,397 µg/mL; na matriz avaliada: 1,985 µg/g), exatidão (médias da % recuperação das sementes de 76,54% e de 90,54% para a polpa) e precisão (coeficientes de variação da % recuperação das sementes foi de 1,24% e 5,12% para a polpa). As sementes de abóboras provenientes da Embrapa demonstraram possuir maior concentração de Cuc B em relação às sementes de *C. moschata* adquiridas no comércio varejista. Isso comprovou a eficiência do aprimoramento genético e fenotípico realizado nas primeiras. O valor médio de Cuc B nestas sementes foi de 5,652 µg/g enquanto que a concentração de Cuc B na farinha das sementes de *C. moschata* foi de 0,752 µg/g.

Abstract

Cucurbita moschata, *C. maxima* and Tetsukabuto are plant species belonging to the *Cucurbitaceae* family, generally used as food, but with nutraceutical properties mainly in the seeds. Some of these therapeutic properties are due to the presence of a group of substances called cucurbitacins. Cucurbitacin B - Cuc B - is a triterpene that can be found free or glycosylated and that has been studied for its pharmacological potential, but still presents a scarcity of data regarding its presence and concentrations in the different species and parts of the fruits. The peels, bagasses and seeds are some of the residues of agroindustrial processing of fruits and vegetables that are generated in great amount and underutilized in human and animal feeding. The present work aimed to develop a method for the production of flours of seeds, pulp and peels of the pumpkins of *C. moschata*, *C. maxima* and Tetsukabuto hybrid and to evaluate the quality of this process from the microbiota point of view. In addition, a method for the detection of Cuc B has been developed in some flours of these samples using extraction and purification steps based on the QuEChERS method followed by quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. An evaluation of Cuc B was also carried out on pumpkin seeds from the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), Tabuleiros Costeiros unit, in Aracaju, Sergipe. The method was validated for selectivity, linearity (0.15 to 100.88 $\mu\text{g} / \text{mL}$), detection limits (instrumental: 0.120 $\mu\text{g} / \text{mL}$, in the matrix evaluated: 0.602 $\mu\text{g} / \text{g}$), quantification limits (instrumental: 0.397 $\mu\text{g} / \text{mL}$; in the matrix evaluated: 1.985 $\mu\text{g} / \text{g}$), accuracy (means of recovery of seeds of 77.42% and 75.66% for two levels of fortification and 90.54% of the pulp for one level of fortification) and precision (coefficients of variation of seeds recovery of 0.86% and 1.61% for two levels of fortification and 5.12% for the pulp at one level of fortification). Embrapa pumpkin seeds showed a higher concentration of Cuc B in relation to *C. moschata* seeds purchased in the retail trade. This proved the efficiency of the genetic and phenotypic improvement carried out in these Embrapa seeds. The mean value of Cuc B, in $\mu\text{g} / \text{g}$ of these seeds, was 5.652 for the pastes and 2.962 for the milled, while the value of the seeds of *C. moschata* was 0.752.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 ASPECTOS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONSUMO DE ABÓBORA.....	19
2.2 <i>Cucurbita sp.</i>	20
2.3 ASPECTOS BOTÂNICOS DOS FRUTOS DAS ESPÉCIES DE <i>Cucurbita sp.</i> ESTUDADAS.....	21
2.4 IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>Cucurbita sp.</i> NA SAÚDE.....	23
2.5 CUCURBITACINAS.....	26
2.6 OCORRÊNCIA DE CUCURBITACINAS EM DEMAIS ESPÉCIES DA FAMÍLIA <i>Cucurbitaceae</i>	28
2.7 FARMACOLOGIA.....	28
2.8 MÉTODO QuEChERS.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
4.2 HIGIENIZAÇÃO.....	34
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	35
4.4 MÉTODOS DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	35
4.5 OBTENÇÃO DAS FARINHAS.....	36

4.6 SOLVENTES, SORVENTES E PADRÃO UTILIZADOS.....	37
4.7 EQUIPAMENTOS.....	38
4.8 MÉTODO DE ANÁLISE DE CUCURBITACINA B.....	40
4.9 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	44
5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	44
5.1 SELETIVIDADE.....	44
5.2 LINEARIDADE	44
5.3 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO (EXATIDÃO).....	45
5.4 PRECISÃO (REPETIBILIDADE).....	45
5.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA.....	46
6.2 OBTENÇÃO DAS FARINHAS DAS ABÓBORAS.....	48
6.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	49
6.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CUCURBITACINA B.....	54
6.5 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	65
6.6 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE CUC B DAS SEMENTES DA EMBRAPA.....	65
6.7 RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE CUC B DAS AMOSTRAS ADQUIRIDAS NO COMÉRCIO VAREJISTA.....	68
6.8 AVALIAÇÃO DE CUCURBITACINA NAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	68
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos da variedade Tetsukabuto.....	21
Figura 2: Fruto da espécie <i>C. moschata</i>	22
Figura 3: Fruto da espécie <i>C. maxima</i>	23
Figura 4: Estrutura química do cucurbitano.....	26
Figura 5: Estrutura química da cucurbitacina B.....	27
Figura 6: Fatiador mecânico.....	36
Figura 7: Secador de alimentos.....	37
Figura 8: Padrão de Cuc B.....	38
Figura 9: Misturador vórtex.....	39
Figura 10: Centrífuga.....	39
Figura 11: Micro-centrífuga de bancada.....	40
Figura 12: Fluxograma do Método de extração implantado.....	41
Figura 13: Fluxograma do Método de purificação implantado.....	42
Figura 14: Equipamento de CLAE utilizado para as análises.....	42
Figura 15: Farinhas das cascas, polpa e sementes da abóbora Tetsukabuto.....	48
Figura 16: Farinha das cascas, polpa e sementes da abóbora <i>C. moschata</i>	49
Figura 17: Farinha das cascas, polpas e sementes da abóbora <i>C. maxima</i>	49
Figura 18: Cromatograma com a FM 38:62 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 µg/mL.....	51
Figura 19: Cromatograma com a FM 30:70 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 µg/mL.....	52

Figura 20: Cromatograma com a FM 34:66 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 µg/mL.....	53
Figura 21: Cromatograma total do branco da amostra (extrato de sementes da Tetsukabuto).....	54
Figura 22: Cromatograma parcial do Extrato de semente (Tetsukabuto) fortificada com 50 µL da solução mãe (756,60 µg/mL).....	55
Figura 23: Cromatograma total do Branco de reagente.....	55
Figura 24: Cromatograma parcial do Branco de reagente (escala aumentada).....	56
Figura 25: Curva analítica 1, utilizada para o cálculo do ensaio de recuperação das sementes da abóbora japonesa fortificadas com 100 µL de solução mãe (756,60 µg/mL). Nível 1 de fortificação (37,83 µg/g).....	58
Figura 26: Curva analítica 2, utilizada para o cálculo do ensaio de recuperação das sementes da abóbora japonesa fortificadas com 50 µL de solução mãe (756,60 µg/mL). Nível 2 de fortificação (25,22 µg/g).....	58
Figura 27: Curva analítica 3, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes da abóbora em pasta com a genética conhecida.....	59
Figura 28: Curva analítica 4, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes moídas da abóbora com a genética conhecida.....	59
Figura 29: Curva analítica 5, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes, polpas e cascas das <i>C. maxima</i> e <i>C. moschata</i>	60
Figura 30: Cromatograma parcial do extrato da casca de <i>C. moschata</i>	69
Figura 31: Cromatograma parcial da solução padrão de concentração 0,691 µg/mL.....	69

Figura 32: Cromatograma do extrato de semente de <i>C. moschata</i> coinjetada com solução do padrão (10,366 µg/mL).....	70
Figura 33: Cromatograma parcial do extrato de semente de <i>C. moschata</i> coinjetada com solução do padrão (10,366 µg/mL) (escala aumentada).....	70
Figura 34: Cromatograma parcial do extrato de sementes da <i>C. maxima</i>	71
Figura 35: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês fortificada com 10,366 µg.....	72
Figura 36: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês.....	72
Figura 37: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês.....	73
Figura 38: Cromatograma parcial do extrato da polpa de <i>C. maxima</i>	73
Figura 39: Cromatograma parcial do extrato da polpa da <i>C. moschata</i>	74
Figura 40: Cromatograma parcial do extrato da casca do híbrido japonês fortificada com 10,366 µg.....	74
Figura 41: Cromatograma parcial do extrato da casca da <i>C. maxima</i>	75
Figura 42: Cromatograma parcial do extrato da casca da <i>C. moschata</i>	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultado da análise microbiológica da <i>Cucurbita maxima</i> antes e depois da higienização.....	47
Tabela 2: Resultado da análise microbiológica da <i>Cucurbita moschata</i> antes e depois da higienização.....	47
Tabela 3: Massas das farinhas obtidas das cascas, polpa e sementes das abóboras.....	48
Tabela 4: Percentual das recuperações das Farinhas de sementes do híbrido Tetsukabuto.....	61
Tabela 5: Percentual das recuperações das Farinhas da polpa do híbrido Tetsukabuto.....	61
Tabela 6: Coeficientes de Variação dos percentuais das recuperações das Farinhas de sementes e polpas do híbrido Tetsukabuto.....	62
Tabela 7: Concentração de Cuc B das sementes em pasta da Embrapa.....	66
Tabela 8: Concentração de Cuc B das sementes moídas da Embrapa.....	66
Tabela 9: Valores médios das concentrações das sementes em pastas e moídas.....	67
Tabela 10: Concentração de Cuc B das sementes adquiridas no mercado varejista.....	67

Lista de Quadros

Quadro 1: Valores das curvas analíticas.....	64
Quadro 2: Valores percentuais das recuperações e seus respectivos coeficientes de variação.....	64
Quadro 3: Limites do método.....	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN: Acetonitrila

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cuc B: Cucurbitacina B

FM: Fase móvel

h: hora(s)

min: minuto(s)

N₂: Nitrogênio

ND: Não determinado

ppm: Partes por milhão

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe

t_R: Tempo de retenção

UV/DAD: Detector de ultravioleta com arranjo de diodos

1 Introdução

As abóboras são plantas rasteiras da família *Cucurbitaceae* e a sua presença ocorre nas regiões tropicais (CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). A *Cucurbita moschata* (abóbora sergipana), a *C. maxima* (abóbora moranga) e a Tetsukabuto (abóbora japonesa, um híbrido de *C. moschata* com a *C. maxima*) são espécies vegetais pertencentes a essa família (TEPPNER, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

As abóboras são cultivadas em diversos países do mundo, como Brasil, México e Índia, para fins alimentares e/ou como medicamento. Algumas de suas aplicações mais relevantes são para o tratamento da diabetes e de enfermidade acometidas por vermes e parasitas (CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006). Contudo, diversas pesquisas demonstram demais propriedades terapêuticas, principalmente nas sementes, as quais quase sempre são subaproveitadas (MANSOUR *et al.*, 1999; NAVES *et al.*, 2010).

Tais propriedades são a sua ação antioxidante, auxiliando na diminuição dos riscos de doenças degenerativas (VERONEZI; JORGE, 2011) ajuda a reduzir os danos provocados pelo sol e atua também como agente anti-inflamatório (YOUNG KIM *et al.*, 2012); as sementes de abóbora são úteis no tratamento da hiperplasia prostática benigna (YOUNIS; GHIRMAY; AL-SHIHRY, 2000); Algumas dessas propriedades terapêuticas se devem à presença de um grupo de metabólitos secundários, substâncias essas denominadas cucurbitacinas (VALENTE, 2004; MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009).

As cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados constituídos por um esqueleto cucurbitano, podendo ser encontrado na forma livre ou glicosilado (DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001). As cucurbitacinas, devido ao radical dessa palavra, são comumente associadas às espécies da família *Cucurbitaceae*, embora essas substâncias também são encontradas em diversas famílias botânicas como, por exemplo, *Begoniaceae*, *Liliaceae* e *Rubiaceae* (DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001; VALENTE, 2004).

As cucurbitacinas atuam como um mecanismo de defesa das plantas. Essas substâncias são conhecidas também pelo nome de aleloquímicos, pois as mesmas

transmitem mensagens entre a planta e os insetos, sendo tóxica para estes (METCALF; METCALF, 1992; MACEDO; GUEDES; GARCIA, 2007).

O presente estudo tem como objetivo subsidiar o desenvolvimento do assunto. É fundamental promover pesquisas para a análise e monitoramento de substâncias de origem natural em alimentos para assegurar a confiabilidade quanto ao potencial nutritivo e funcional, além de diminuir o risco de enfermidades pelo consumo desses alimentos. É necessário ressaltar que, dependendo da concentração na qual esses compostos se encontram, podem resultar em efeito tóxico ou serem considerados nutracêuticos, caracterizando dessa forma um alimento funcional.

2 Revisão de literatura

2.1 Aspectos gerais de produção e consumo de abóbora

Além do valor econômico e alimentar, o cultivo de cucurbitáceas no Brasil, em especial as abóboras, tem grande importância social na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda grande quantidade de mão-de-obra, desde o cultivo até a comercialização. A pesquisa de Orçamento Familiar 2008-2009, realizada em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) concluiu que o consumo *per capita* de abóbora foi de 1,19 kg, com maior consumo no Nordeste com 1,24 kg, sendo no Piauí 2,62 kg.

A produção mundial de abóboras, em 2010, foi de 22,4 milhões de toneladas, cultivadas em área de 1,67 milhões de hectares, proporcionando uma produtividade média de 13,4 toneladas por hectare (t/ha) (FAO, 2012). No Brasil, os dados referentes à comercialização são escassos, sendo a última informação disponível em 2006, com área colhida de 88.203 ha e 384.916 t produzidas, que proporcionaram uma produtividade média de 4,4 t/ha. O valor da produção foi de 1,52 milhões de reais, cultivada em mais de 127 mil estabelecimentos agropecuários (IBGE, 2012). As abóboras são produzidas em todo o território nacional, sendo que os estados do Nordeste representaram 24,1% da produção nacional e os maiores produtores são a Bahia, Maranhão e Pernambuco. As abóboras são bastante difundidas na região Nordeste, onde é considerada também cultura de subsistência (IBGE, 2006; CARMO *et al.*, 2011).

2.2 *Cucurbita* sp.

A abóbora é o fruto da aboboreira, uma planta rasteira da família *Cucurbitaceae*. Essa família é formada por cerca de 120 gêneros que contêm mais de 800 espécies de ocorrência nas regiões tropicais. No Brasil, há em torno de 30 gêneros e 200 espécies. As espécies de notável importância econômica e alimentar são: *Cucurbita moschata* (nome vulgar: abóbora sergipana), *C. maxima* (nome vulgar: abóbora moranga) e *C. pepo* (nome vulgar: abobrinha) (TEPPNER, 2004; CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). Há ainda um tipo híbrido bastante consumido em nosso país conhecido como abóbora japonesa ou Tetsukabuto (do japonês “capacete de ferro”) devido aos frutos de formato arredondado e de coloração verde-escura. Tal híbrido, resultante do cruzamento da *C. maxima*, como progenitor feminino, e a *C. moschata*, como progenitor masculino, apresenta algumas vantagens comparadas com as demais espécies de abóbora. As vantagens são: possui uma maior vida de prateleira; os frutos apresentam-se mais atraentes, saborosos e enxutos; os consumidores têm dado preferência aos híbridos japoneses por serem frutos menores, pesando de 1 a 2 Kg (NASCIMENTO; PESSOA; SILVA, 2011). Outras espécies de abóbora apresentam-se muitas vezes bem maiores em tamanho e peso, o que resulta em fracionamento do fruto para venda, o que é uma desvantagem em termos de estocagem doméstica.

As aboboreiras, sendo plantas de clima tropical, não se desenvolvem em temperatura igual ou inferior a 10°C, não sobrevivendo quando atingida por geadas. As baixas temperaturas também inibem a germinação das sementes. Portanto, as temperaturas ideais ao seu desenvolvimento são as relativamente mais altas, na faixa de 18-24°C. A combinação de temperatura ideal com boas quantidades de chuvas favorece a sua produção, embora a umidade relativa do ar muito elevada possa propiciar o surgimento de doenças e pragas (SOUSA; PEIXOTO; TOLEDO, 1995).

Comumente classificada como hortaliça, a abóbora possui diferentes denominações no Brasil, como moranga, na região Sul, e jerimum, na região Norte e Nordeste. Originária das Américas, as abóboras fizeram parte da alimentação de muitos povos, como os astecas, incas e maias. Graças à polinização cruzada, existem diversas

espécies e variedades de abóboras, que podem variar em relação às cores, formas e texturas. Algumas podem chegar a pesar até 30 Kg. Em seu interior há polpa e sementes (CORRÊA, 1984).

As abóboras são cultivadas desde o norte do México à Argentina e foram difundidas na Europa e na Ásia. É uma planta rasteira que pode ser cultivada desde o nível do mar até em altitudes elevadas (YADAV *et al.*, 2010). Segundo este mesmo autor, em seu artigo de revisão, os frutos das abóboras contêm diversos fitoconstituintes da categoria dos alcalóides e flavonóides. Além disso, foram relatadas importantes propriedades medicinais como: antidiabético, antioxidante, anti-carcinogênico e anti-inflamatório.

2.3 Aspectos botânicos dos frutos das espécies de *Cucurbita* sp. estudadas

Híbrido Tetsukabuto (abóbora japonesa)

Os frutos são geralmente achatados, podendo-se encontrar também da forma esférica ou ovóide (figura 1). As cascas são duras, de coloração verde-escura apresentando manchas verde-pálidas ou listras brancas. A polpa do fruto é relativamente fina, de cor amarelo-alaranjada, aromática e pouco fibrosa (CORRÊA, 1984). Essa variedade é um híbrido resultante do cruzamento da *C. maxima*, como progenitor feminino, e a *C. moschata*, como progenitor masculino. Bastante consumida em nosso país e conhecida como abóbora japonesa ou Tetsukabuto (do japonês “capacete de ferro”), devido aos frutos apresentarem formato arredondado e coloração verde-escura como já mencionado (NASCIMENTO; PESSOA; SILVA, 2011).



Figura 1: Frutos da variedade Tetsukabuto.

Cucurbita moschata (abóbora sergipana)

Cucurbita moschata é uma espécie de abóbora nativa da América Central e do norte da América do Sul, onde foi aproveitada na agricultura. Os seus frutos variam consideravelmente em tamanho e forma devido à grande variabilidade genética encontrada nessa espécie (figura 2). Os frutos, normalmente, são colhidos maduros na época de outono e denominados de abóboras de inverno. A casca dos frutos, em geral, apresenta sulcos pouco proeminentes, a polpa apresenta uma coloração alaranjada média e as sementes são ovais-oblongas e possuem coloração amarelada (CORRÊA, 1984; Missouri Botanical Garden. *Cucurbita moschata*. Disponível em: <www.missouribotanicalgarden.org> Acesso em: 11 de dezembro de 2016).



Figura 2: Fruto da espécie *C. moschata*.

Cucurbita maxima (abóbora moranga)

Os frutos possuem o formato deprimido-globoso bem sulcado e de tamanho variável (figura 3). Quando maduro apresenta-se oco, contém polpa pouco fibrosa e possui sementes chatas de forma elíptica, com margens túmidas características (CORRÊA, 1984). *Cucurbita maxima* é uma espécie de abóbora nativa das áreas subtropicais da América do Sul (sul do Brasil, Argentina e Uruguai) e nessas regiões foi aproveitada para agricultura. Os seus frutos possuem normalmente formato arredondado, mas pode se encontrar, em algumas variedades, no formato cilíndrico. Os frutos, geralmente, são colhidos maduros na época de outono e denominados também de

abóboras de inverno. Esta espécie inclui uma grande variedade de abóboras que podem apresentar coloração que variam do azulado, cinza, verde pálido, alaranjado ao multicolorido (Missouri Botanical Garden. *Cucurbita maxima*. Disponível em: <www.missouribotanicalgarden.org> Acesso em: 11 de dezembro de 2016).



Figura 3: Fruto da espécie *C. maxima*

2.4 Importância das espécies de *Cucurbita sp.* para a saúde humana

Além da polpa da abóbora ser amplamente utilizada como fonte de alimentação, na Grécia as sementes de abóbora são consumidas em quantidades consideráveis na forma torrada e salgada. Na Áustria, o óleo da semente de abóbora é muito apreciado para tempero de saladas em função de seu aroma e gosto característicos (EL ADAWY; TAHA, 2001). A semente de abóbora pode ser considerada boa fonte de proteína e de óleo, possibilitando o seu uso no enriquecimento de alimentos e aumentando, assim, as concentrações proteicas de preparações alimentares, além de reduzir custos na produção, uma vez que as sementes, geralmente, não são utilizadas para esse fim (MANSOUR *et al.*, 1999). Portanto, o emprego das sementes agrega valor econômico à produção,

contribui para a formulação de novos produtos alimentícios e minimiza o desperdício (NAVES *et al.*, 2010).

A *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata* e a *Cucurbita maxima* são as espécies de maior valor nutricional e econômico e diferem quanto ao formato, tamanho, cor da casca, cor da polpa, firmeza, teor de amido, teor de matéria seca e sabor. Sob o ponto de vista nutricional, são importante fontes de carotenóides, que assumem grande destaque na alimentação humana e devido ao seu potencial de ação antioxidante, que pode auxiliar na diminuição dos riscos das doenças degenerativas (como as cardiovasculares, câncer e obesidade, dentre outras). As abóboras são muito apreciadas e consumidas sob as formas de doces ou em diversos pratos salgados (VERONEZI; JORGE, 2011).

Em espécies de abóboras oriundas da Áustria foi confirmado que a *Cucurbita moschata* tem variação de 0,98-5,9 mg/100g de α -caroteno, 3,1-7mg/100g de β -caroteno e 0,08-1,1 mg/100g de luteína e zeaxantina. Já na *Cucurbita maxima* foram encontrados valores de 0-7,5 mg/100g de α -caroteno, 1,4-7,4 mg/100g de β -caroteno e 0,8-17 mg/100g de luteína e zeaxantina. A *Cucurbita pepo* apresenta 0,03-0,15 mg/100g de α -caroteno, 0,06-2,3 mg/100g de β -caroteno e 0-1,8 mg/100g de luteína e zeaxantina (MURKOVIC *et al.*, 2004; VERONEZI; JORGE, 2011).

As sementes secas de *Cucurbita pepo* são consumidas na África Oriental para tratar teníase e constituem uma alternativa para a falta de assistência farmacêutica, não apenas nesse local do mundo, mas em diversas regiões onde as condições sanitárias são precárias. As sementes dessa espécie de abóbora, além dos quatro principais ácidos graxos contidos em seu óleo, também possuem proteínas (38%), α -tocoferol (3 mg/100 g) e carboidratos (37%). Também é uma fonte de ácido linoléico (47,0% do total de ácidos graxos constituintes de seu óleo). Durante muitos anos, particularmente na Europa, extratos de sementes de *C. pepo*, têm sido utilizados na medicina popular como um medicamento benéfico para a dificuldade de micção causada por hiperplasia prostática benigna - BPH (YOUNIS; GHIRMAY; AL-SHIHRY, 2000).

As abóboras tem sido utilizadas nas terapias tradicionais de diversos países, tais como China, Argentina, Índia, México, Brasil e Coréia do Sul, pois a polpa e as sementes são ricas não somente em proteínas, vitaminas antioxidantes, carotenóides, tocoferóis e minerais, mas possuem baixo teor de gordura e calorias. O β -caroteno reduz o dano na pele provocado pelo sol e age como agente anti-inflamatório. O α -caroteno é conhecido

por diminuir o processo de envelhecimento, reduz os riscos do desenvolvimento de catarata e previne o crescimento de tumores. A vitamina E (tocoferol) protege as células de dano oxidativo por prevenir a oxidação de ácidos graxos insaturados na membrana celular (YOUNG KIM *et al.*, 2012).

Stevenson *et al.* (2007) verificou a composição de ácidos graxos e tocoferóis no óleo de sementes de 12 plantios diferentes de *C. maxima*, cultivados em Iowa, EUA. A concentração de óleo variou de 10,9% até 30,9%. O teor de ácidos graxos insaturados variou de 73,1 até 80,5%. Foram também observadas diferenças significantes em relação ao teor dos ácidos esteárico, oléico, linoléico e gadoléico entre as diferentes amostras pesquisadas, tendo sido observado baixos níveis de ácido linoléico (<1%). O conteúdo de tocoferol dos óleos variou de 27,1 a 75,1 µg/g de óleo para α-tocoferol, de 74,9 a 492,8 µg/g para γ-tocoferol e de 35,3 para 1109,7 µg/g para δ-tocoferol. Esse estudo demonstrou o potencial do óleo de sementes de abóbora em possuir alta estabilidade oxidativa, o que é bem adequado para aplicações industriais, inclusive na produção de alimentos, pois dessa forma poderá melhorar a nutrição de dietas humanas, principalmente pelo seu conteúdo de tocoferol e seu alto grau de insaturação.

Plantas para a dieta e preparações herbais tem sido tradicionalmente usadas como medicamento nos países em desenvolvimento e aconteceu recentemente uma volta do seu uso nos Estados Unidos e na Europa. As abóboras estão sendo amplamente utilizadas na medicina tradicional para diversos fins (antidiabético, antihipertensivo, antitumoral, imunomodulador, antibacteriano, antihipercolesterolêmico, antiparasitário intestinal e anti-inflamatório). Isso focou a atenção dos pesquisadores nessas espécies. Na medicina popular brasileira utiliza-se também outras espécies pertencentes à família *Cucurbitaceae* como a “buchinha” (*Luffa operculata*), o “taiuíá” (*Wibbrandia ebracteata* e/ou *Cayaponia tayuya*) e a “nhandiroba” (*Fevillea trilobata*) (VALENTE, 2004).

Devido ao material seco possuir 40–50% de lipídios e de 30–37% de proteínas, as sementes de abóbora representam uma fonte de alta energia e são muito consumidas no mundo, com crescente popularidade (CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006).

No tratamento convencional das infecções por *Giardia lamblia* os fármacos de escolha são o metronidazol e outros derivados nitroimidazóis. Em um estudo foi investigada a avaliação da atividade biológica do extrato aquoso e metanólico das sementes de *Cucurbita pepo* sobre o crescimento de *G. lamblia*. Os extratos avaliados

demonstraram possuir atividade giardicida. O extrato aquoso apresentou 78,6% de inibição no crescimento de *G. lamblia* na concentração de 1,0 mg/ mL. O extrato metanólico apresentou 100% de inibição na concentração de 0,516 mg/ml (GONZÁLEZ; GARZA; GUTIÉRREZ, 2010).

A atividade anti-helmíntica das cucurbitáceas é atribuída aos metabólitos secundários. Os possíveis metabólitos secundários para a atividade anti-helmíntica em sementes de cucurbitáceas pertence ao grupo de compostos triterpênicos altamente oxigenados denominado cucurbitacinas. (VALENTE, 2004; MARIE-MAGDELEINE *et al.*, 2009).

As sementes de abóbora são úteis no tratamento da hiperplasia prostática benigna. As cucurbitacinas oriundas das sementes freiam o desenvolvimento da enzima 5- α -redutase, evitando que esta atue e converta a testosterona em di-hidrotestosterona, hormônio responsável por estimular a reprodução das células prostáticas (DUKE, 2000). Existe também aproximadamente 1% de fitoesteróis presentes nas formas livres e ligadas, esqualeno (usados como indicadores quando se suspeita de adulteração de óleos), pigmentos de clorofila e 4 a 5% de minerais incluindo selênio, zinco, cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo e potássio (ABDEL-RAHMAN, 2006; CAILI, HUAN; QUANHONG, 2006).

2.5 Cucurbitacinas

As cucurbitacinas são definidas como triterpenos tetracíclicos altamente oxigenados, sendo constituído por um esqueleto cucurbitano 19 (10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanost-5-eno (figura 4), que pode ser encontrado na forma livre ou glicosilado (DINAN, HARMATHA; LAFONT, 2001). Tais compostos não podem ser considerados como esteroidais, pois o grupamento metila localiza-se no carbono 9 e não no 10 (MIRÓ, 1995). Essas substâncias possuem relevante interesse devido à extensa gama de atividades biológicas que exibem nas plantas e nos animais (TANNIN-SPITZ; BERGMAN; GROSSMAN, 2007).

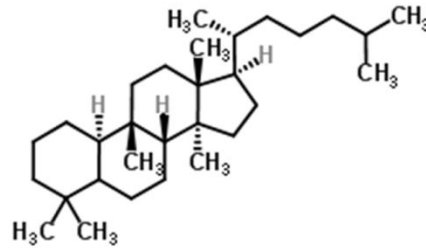


Figura 4: Estrutura química do cucurbitano

As cucurbitacinas B (figura 5) e E pertencem ao grupo de substâncias secundárias amargas formadas nas plantas da família *Cucurbitaceae*. Os demais princípios amargos normalmente são derivados das cucurbitacinas B e E, produzidos como um resultado de processos metabólicos que somente ocorrem durante os estádios mais tardios do desenvolvimento da planta (SCHABORT; POTGIETER; DE VILLIERS, 1968). A síntese das cucurbitacinas nas plantas ocorre a partir do ácido mevalônico e através de ações enzimáticas que ocorrem durante o desenvolvimento e a maturação das plantas (METCALF; METCALF, 1992; MACEDO; GUEDES; GARCIA, 2007).

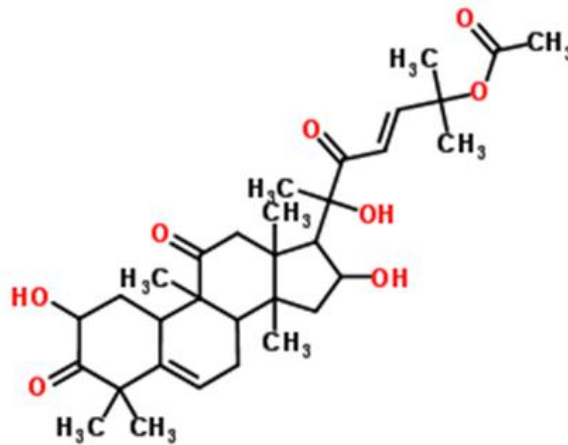


Figura 5: Estrutura química da cucurbitacina B

As cucurbitacinas são mais comumente associadas às espécies da família *Cucurbitaceae*, mas têm sido detectadas também em várias outras famílias botânicas, como: *Begoniaceae*, *Chrysobalanaceae*, *Cruciferae*, *Datiscaceae*, *Desfontaniaceae*,

Elaeocarpaceae, *Flacourtiaceae*, *Lauraceae*, *Liliaceae*, *Polemoniaceae*, *Primulaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Sterculiaceae* e *Thymelaeaceae* (DINAN; HARMATHA; LAFONT, 2001; VALENTE, 2004).

Essas substâncias, conhecidas pelo seu amargor e toxicidade (CHEN *et al.*, 2005), são produzidas pelas plantas. A razão dessa produção se deve ao fato das mesmas atuarem sobre os insetos impondo barreiras à herbivoria. Esses compostos químicos são conhecidos também como aleloquímicos, pois são substâncias que transmitem mensagens entre plantas e insetos. As cucurbitacinas são tóxicas para a maioria dos insetos, porém devido ao fenômeno de evolução, algumas espécies de besouros adultos do gênero *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) utilizam as cucurbitacinas como estimulante de alimentação (METCALF; METCALF, 1992; MACEDO; GUEDES; GARCIA, 2007).

2.6 Ocorrência de Cucurbitacinas em demais espécies da família *Cucurbitaceae*

Segundo Alghasham (2013), as raízes e os frutos da abóbora são os órgãos nos quais as cucurbitacinas estão em maiores quantidades, porém o seu artigo não aponta especificamente o quanto de concentração existe nas diferentes partes das espécies estudadas. As cucurbitacinas A e B foram detectadas nos frutos de *Trichosanthes cucumerina* (DUAGMANO *et al.*, 2012). A cucurbitacina B foi isolada nos frutos de *Cucurbita andreana* e nas raízes de *Wilbrandia ebracteata* (taiuiá), sendo que nas raízes desta última obteve-se rendimento de 0,002%. Nos frutos de *Luffa operculata* (buchinha) foi encontrado o rendimento de 0,12% (LANG *et al.*, 2012). Os glicosídeos de cucurbitacina foram encontrados também nos frutos de *Citrullus colocynthis* (pepino amargo), com rendimento de 0,05% (AYYAD *et al.*, 2012).

A cucurbitacina E e o seu glicosídeo (elaterina) foram encontrados nos frutos de *Bacopa monnieri*, *Cucurbita andreana* e *Citrullus colocynthis* (pepino amargo). A cucurbitacina D (elatericina A) em *Trichosanthes kirilowii* (pepino chinês) e em *Cucurbita andreana*. Diidrocurbitacina B foi encontrada em *Wilbraandia ebracteata* (taiuiá), nas raízes, com rendimento de 0,04%, *Trichosanthes kirilowii* (pepino chinês) e *Cayaponia tayuya* (taiuiá). A Cucurbitacina I e o seu glicosídeo (elatericina B) foram encontrados nas espécies *Momordica balsamina* L. (pêra balsâmica), *Cayaponia tayuya*

(taiuiá), *Cucurbita andreana* e *Citrullus colocynthis* (pepino amargo). As cucurbitacinas Q e R na *Cayaponia tayuya* (taiuiá) (ALGHASHAM, 2013).

2.7) Farmacologia

O grande interesse nas cucurbitacinas está relacionado principalmente à sua toxicidade e ao seu amplo espectro de atividades biológicas e dentre elas destacam-se as atividades citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória, fago-repelente, hepatoprotetora, purgativa e antimicrobiana (VALENTE, 2004; KAYA; MELZIG, 2008).

Diversas espécies pertencentes à família *Cucurbitaceae* tais como *Citrullus colocynthis* (sementes), *Ecballium elaterium* (frutos), *Bryonia* (raízes) são utilizadas tradicionalmente como purgativos, embora os seus usos venham diminuindo devido à colocação no mercado de outros produtos farmacêuticos para esse fim. Isso é devido à ação tóxica das cucurbitacinas, pois em alguns casos gera efeito catártico hidragogo (BRUNETON, 1993).

Com o objetivo de melhorar o aproveitamento das sementes de abóbora, Jang *et al.* (2008) realizou o isolamento de substâncias amargas (principalmente a cucurbitacina E) as quais não foram vistas em si nas abóboras, mas biossintetizadas durante a germinação das sementes. Nesse mesmo estudo, ensaios *in vitro* demonstraram que a cucurbitacina E isolada e purificada não possuía apenas um efeito apoptótico nas células cancerosas da próstata e do pulmão, mas também uma atividade anti-inflamatória por inibir a ação da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), porém sem efeito na enzima COX-1. As cucurbitacinas B, D e I também são relatadas por inibirem a COX-2 (JAYAPRAKASAM; SEERAM; NAIR, 2003).

As cucurbitacinas B e E possuem um efeito sobre a hepatite crônica, normalizando os níveis de proteínas hepáticas, estimulando as funções de imunidade celular e aumentando a taxa de AMPc/GMPc no plasma de cobaias. Hu *et al.* (1982) relatou que *Cucumis melo*, utilizado como medicamento na medicina tradicional chinesa, possui as cucurbitacinas B e E, que auxiliam no combate contra a hepatite.

Graziose *et al.* (2013) descreveu nove glicosídeos de cucurbitacina que foram isolados das partes aéreas de *Datisca glomerata*, planta da família *Datisceae*, tendo sido sete desses nove glicosídeos descritos pela primeira vez. Nesse mesmo estudo todos os compostos demonstraram atividade antiplasmódica moderada *in vitro*.

Uma espécie empregada na medicina tradicional do Irã (*Citrullus colocynthis*) foi investigada e concluiu-se que dois glicosídeos de cucurbitacina apresentam notável atividade antioxidante. Estes compostos foram isolados através do extrato hidro-metanólico dos frutos dessa espécie (DELAZAR *et al.*, 2006).

O tubérculo de *Trichosanthes kirilowii* é a fonte de um medicamento tradicional que exibe vários efeitos incluindo atividade antidiabética e anticâncer em várias células tumorais (KIM *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo foi relatado que a cucurbitacina D (Cuc D) isolada de *Trichosanthes kirilowii* também induz apoptose em diversas células cancerosas. Nesse estudo foi testado o efeito do extrato etanólico de *Trichosanthes kirilowii* (TKE) ou Cuc D na supressão do crescimento celular e indução da apoptose através da inibição da atividade da STAT3, um fator de transcrição oncogênico que é observado em diversos tumores malignos que acometem humanos. STAT3 é um membro da família STAT que atua na transdução do sinal e ativação da transcrição, nas células cancerosas dos seios. Foi observado que ambos TKE e Cuc D suprimiram a proliferação e induziram apoptose e parada no ciclo celular na fase G2/M nas células cancerosas dos seios (linhagem MDA-MB-231) pela inibição da fosforilação da STAT3.

Silva *et al.* (2015) descreveu um novo derivado semissintético da cucurbitacina B (DACE) como um potente inibidor da proliferação de células cancerígenas do pulmão (NSCLC). Nesses estudos *in vitro* sobre o DACE, este interrompeu o ciclo celular das células epiteliais do pulmão bloqueando a divisão celular na fase G2/M e induziu a apoptose celular por interferir com a ativação do EGFR e sua sinalização, incluindo AKT, ERK e STAT3. De acordo com os resultados *in vitro* desse estudo, a aplicação intraperitoneal de DACE suprimiu significativamente o crescimento das NSCLC de ratos nos quais cresciam os pneumócitos alveolares do tipo 2.

Moléculas naturais estão sob intensivos estudos devido ao potencial de atuar, como princípio ativo ou como adjuvante, em terapias contra desordens neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Parkinson (PD). Arel-Dubeau *et al.* (2014) avaliou o potencial neuroprotetor da cucurbitacina E (Cuc E) extraída de

Ecballium elaterium (Cucurbitaceae), utilizando um modelo de célula de PD. No experimento pós-mitótico as células neuronais foram tratadas com uma toxina parkinsoniana, 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) para provocar significativo dano celular e apoptose ou com a potente *N,N*-dietilditiocarbamato (DDC) para induzir a produção de superóxido, e a Cuc E foi administrada previamente e durante o tratamento neurotóxico. Foram medidas a morte celular e as espécies reativas de oxigênio para avaliar as propriedades antioxidantes e antiapoptóticas da Cuc E. Estes dados, portanto, indicam que a Cuc E diminui a morte neuronal em células modelo pós-mitóticas de PD. Nesse experimento a cucurbitacina E foi extraída do suco do fruto de *Ecballium elaterium*, com um rendimento de 52% da elaterina (glicosídeo da cucurbitacina E). A pureza do composto (98,24%) foi analisada por espectroscopia e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

Toker *et al.* (2003), em sua pesquisa, objetivou aumentar o rendimento de cucurbitacina B dessa espécie (*Ecballium elaterium*) através da técnica da cultura de tecido. Esse mesmo autor menciona que o suco da fruta de *Ecballium elaterium* é empregado para o tratamento da sinusite na medicina popular turca.

Em um estudo realizado por Duangmano *et al.* (2012) foi investigada a resposta molecular da cucurbitacina B nas células cancerosas dos seios em humanos (linhas genéticas MCF-7 e MDA-MB-231). Os efeitos inibitórios sobre o crescimento na estrutura morfológica dos microtúbulos e na polimerização foram analisados usando técnica de imunofluorescência e um kit de ensaio de polimerização de tubulina, respectivamente. Uma análise proteômica foi usada para identificar as proteínas alvo específicas, envolvidas no tratamento pela cucurbitacina B. Como resultado desse estudo foi observado que a cucurbitacina B exibiu fortes efeitos antiproliferativos contra as células cancerosas dos seios de um modo dose-dependente. Foi demonstrado que a cucurbitacina B altera o sistema citoesquelético das células cancerosas dos seios, induzindo rápidas mudanças morfológicas e polimerização imprópria do sistema de microtúbulo.

Kaushik, Aeri e Mir (2015), em seu artigo de revisão, relata que os triterpenóides presentes em frutos da espécie *Momordica charantia* são conhecidos por suas atividades antidiabética e anticâncer. A via do AMPK é descrita como sendo o provável mecanismo para o estímulo da translocação de GLUT4 por triterpenóides de momordica, resultando

no aumento da oxidação de ácidos graxos, inibindo a síntese de lipídeos e consequentemente melhorando a ação da insulina. Em outro estudo descrito por esse autor foi mencionado que um análogo da 23,24-diidrocurbitacina F da espécie *Hintonia latiflora* possui ação hipoglicêmica e antihiperlipidêmica devido ao seu envolvimento no estímulo da liberação de insulina e na regulação do metabolismo do glicogênio hepático.

Silva *et al.* (2011), em sua pesquisa, avaliou a qualidade físico-química de farinha de sementes de abóbora e concluiu que os componentes funcionais presentes nos resíduos subutilizados (dentre eles as sementes) pelas indústrias tem favorecido pesquisas focadas à melhoria da alimentação humana. Nesse mesmo artigo o autor menciona que as sementes de abóbora possuem cucurbitacina com ação anti-helmíntica.

2.8 Método QuEChERS

O método QuEChERS (sigla inglesa para rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro) objetiva a extração de substâncias de matrizes complexas para análise. Baseia-se na extração por acetonitrila e extração em fase sólida dispersiva. Esse método, desenvolvido por LEHOTAY *et al.* (2003), é um método simples e econômico e foi concebido inicialmente para a análise/determinação de resíduos de pesticidas em frutos e vegetais.

O procedimento envolve extração monofásica inicial da amostra com acetonitrila, seguido pelo particionamento líquido-líquido formado pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A remoção de água residual e a etapa de purificação (“clean up”) são realizadas simultaneamente através de um procedimento rápido denominado de extração em fase sólida dispersiva, no qual sulfato de magnésio anidro e os sorventes PSA e/ou C18 são misturados com 1 mL do extrato de acetonitrila obtido. A referida etapa de purificação efetivamente remove diversos componentes polares como os ácidos orgânicos, certos pigmentos polares e açúcares. O método multi-resíduos QuEChERS é uma abordagem simples e rápida, pois minimiza o número de etapas analíticas, utiliza relativamente poucos reagentes e em pequenas quantidades e requer o uso de pouca vidraria (LEHOTAY *et al.*, 2003).

A escolha desse método em vez dos métodos clássicos fitoquímicos se deve ao fato do objetivo do presente trabalho ser a análise apenas de uma classe de substâncias

(cucurbitacina). O método multiresíduos QuEChERS possui as vantagens de ser um método bem mais econômico e rápido comparado com o método fitoquímico, que envolve extrações envolvendo o gasto de grande quantidades de solventes e de tempo. Enquanto que pelo método QuEChERS a duração da extração é de cerca de 1 h, pelo método clássico essa duração pode ser até de dias (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; LEHOTAY, ANASTASSIADES; MAJORS, 2010).

Calculam-se reduções de aproximadamente 95% do consumo de solventes (10 versus 535 mL para cada amostra) e 90% do tempo. Além disso, o método prova ser útil em matrizes de origem vegetal e de possibilitar a recuperação das amostras após as análises, já que estas não são degradadas (LEHOTAY, ANASTASSIADES, MAJORS, 2010).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver, otimizar e validar um método para análise de cucurbitacina B em abóboras por CLAE-UV/DAD.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter as farinhas das cascas, polpas e sementes das três espécies de abóboras mais comuns no Brasil (*C. moschata*, *C. maxima* e a híbrida Tetsukabuto), incluindo também exemplares de sementes desenvolvidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), unidade Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe. Avaliar a qualidade do processo que envolve a obtenção das farinhas sob o ponto de vista da microbiota;

- Validar o método desenvolvido quanto à seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão;

- Analisar a concentração de Cuc B nas amostras oriundas do comércio local e nas sementes cedidas pela Embrapa através do método desenvolvido.

4 Materiais e métodos

4.1 Descrição das amostras

Os materiais analisados neste estudo foram primeiramente as amostras de abóboras das espécies *Cucurbita maxima* (nome popular: abóbora moranga), *C. moschata* (nome popular: abóbora sergipana) e do híbrido destas duas espécies, conhecida por Tetsukabuto (nome popular: abóbora japonesa). Todos os frutos foram adquiridos no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro, e cada amostra coletada foi pesada em balança Filizola (modelo CS-15). A massa total das abóboras Tetsukabuto foi de 10,655 Kg (5 frutos). A de *C. moschata* foi 12,920 Kg (2 frutos) e a da *C. maxima* foi 7,703 Kg (4 frutos). Foram separadas as cascas, polpas e sementes para a obtenção das farinhas.

O segundo tipo de matéria-prima foram as sementes de abóbora cedidas pela unidade Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada em Aracaju, Sergipe. Estas sementes possuem uma genética conhecida, isto é, possuem suas características fenotípicas correlacionadas ao genótipo da planta. Foram avaliadas neste trabalho quatro amostras diferentes de sementes. Os quatro tipos de sementes foram S1, com 200 sementes (36,6325 g de farinha), S2 com 100 sementes (20,2643 g de farinha), S8 com 100 sementes (12,9468 g de farinha) e S-XD, com 50 sementes (8,8042 g de farinha).

4.2 Higienização

O preparo das matérias-primas foi realizado no setor de Engenharia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Unidade do Rio de Janeiro. Todas as amostras (Tetsukabuto, *C. maxima* e *C. moschata*) foram higienizadas através da lavagem dos frutos em água corrente por três vezes, no mínimo, com o auxílio de uma esponja nova para remoção física de sujidades em toda superfície externa de cada fruto.

Após esta lavagem, para as amostras de abóbora da espécie *C. maxima* foi realizada a imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 30 minutos seguido de enxágue com água destilada. Os frutos de *C. moschata* e de Tetsukabuto não foram submetidos ao tratamento com hipoclorito de sódio 200 ppm.

4.3 Análise microbiológica

Para as amostras de abóboras das espécies *C. maxima* e *C. moschata* foram realizadas análise microbiológica, com os seguintes procedimentos:

- Rinsagem dos frutos com água peptonada antes e depois da higienização;
- inoculação desta água peptonada antes e depois da higienização;
- contagem de colônias bacterianas de espécimes aeróbias mesófilas e também a contagem de fungos filamentosos e leveduras.

Nas amostras “depois da higienização” também foram feitas análises para a detecção de *Salmonella* spp.

4.4 Métodos da análise microbiológica

A referência completa do método utilizado encontra-se no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (2001).

4.4.1 Contagem Padrão de Bactérias Aeróbias Mesófilas

A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas em placas é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Esse método não diferencia os tipos de bactérias. É utilizado para a obtenção de informações gerais sobre a qualidade dos produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira.

4.4.2 Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos nos quais a maioria é oriunda do solo ou do ar. As espécies de bolores são extremamente versáteis, pois a maioria é capaz de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. A quantificação de bolores e leveduras em alimentos é realizada pelo método de contagem padrão em placas.

4.4.3 Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos

A técnica tradicional de detecção de *Salmonella* em alimentos é um método cultural clássico para a observação da presença/ausência, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção em diversas situações, incluindo as extremamente desfavoráveis.

Esse pode ser o caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella* e/ou nos alimentos em que as células de *Salmonella* são encontradas em um número bastante reduzido e/ou alimentos em que as células se encontram injuriadas devido aos processos de preservação como aplicação de calor, congelamento e secagem. Os procedimentos recomendados seguem basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento: 1) Pré-enriquecimento em caldo não seletivo; 2) Enriquecimento em caldo seletivo; 3) Plaqueamento diferencial; 4) Confirmação.

4.5 Obtenção das farinhas

O preparo das farinhas foi realizado no setor de Engenharia da Embrapa Agroindústria de Alimentos, unidade de Guaratiba, Rio de Janeiro. Neste local as bancadas e utensílios utilizados são em aço inoxidável. Todos os procedimentos para separar as sementes, polpas e cascas foram realizados nessas bancadas. As abóboras, depois de higienizadas, foram cortadas no sentido longitudinal (em fusos) e as cascas foram retiradas dos frutos com o uso de um descascador caseiro comum. As sementes, associadas à mucilagem da polpa, foram separadas e lavadas em água corrente para a remoção da mucilagem. A polpa foi cortada utilizando um fatiador mecânico da JB Eletro Junior (figura 6). Todas as frações de sementes, casca e polpa de abóbora foram então submetidas ao processo de secagem. Foi utilizado, para isso, um secador de alimentos com aeração (1500W) (figura 7) projetado e construído nesta Planta de Engenharia.

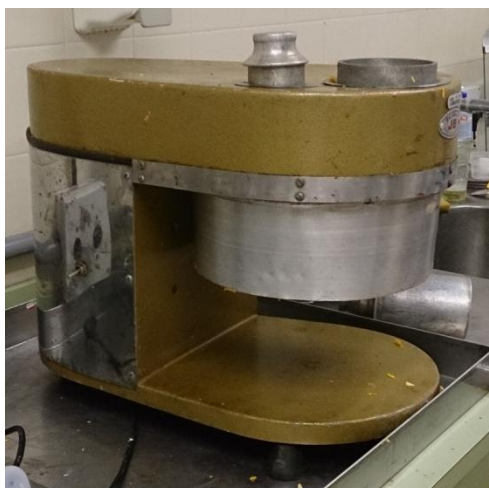


Figura 6: Fatiador mecânico



Figura 7: Secador de alimentos

As frações das matérias-primas referentes às abóboras Tetsukabuto (casca, polpa e sementes) foram desidratadas nesse secador de alimentos a uma temperatura média de $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 40 horas.

No caso das matérias-primas de *C. maxima* e *C. moschata* (casca, polpa e sementes) a temperatura média do secador foi de $48\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 70 horas. A diferença nas temperaturas de secagem se deve ao período de tempo que as amostras foram submetidas para a secagem. A temperatura ao longo da secagem das matérias-primas foi verificada usando um termômetro digital calibrado (precisão $0,1^{\circ}\text{C}$). Como as sementes cedidas pela Embrapa já vieram secas não foi necessária a etapa de secagem para essas sementes.

As amostras secas foram moídas em moinhos de facas e martelos para a obtenção dos 3 tipos de farinhas (sementes, polpa e casca). Nesta etapa todas as amostras moídas passaram por peneiras de 0,8 mm.

4.6 Solventes, sorventes e padrão utilizados

Solventes orgânicos:

- Acetonitrila grau LC-MS (J. T. Baker, Center Valley – EUA);

- Metanol grau HPLC (Tedia, Fairfield – EUA);
- Acetato de etila grau pesticida (Tedia, Fairfield – EUA);

A água ultrapura utilizada foi produzida a partir da utilização do sistema de purificação de água fabricado pela Millipore, composto pelos módulos Rios, Millipore Advantage A10 e Milli-Q.

Sorventes utilizados para o “clean up”:

- Sulfato de magnésio anidro com pureza de 99,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis – EUA);
- Óxido de alumínio (Merck, Darmstadt – Alemanha);
- Bondesil-C18 (Agilent Technologies, EUA).

Padrão:

O padrão adquirido (figura 8) foi o hidrato de cucurbitacina B da Sigma-Aldrich (Reino Unido) com 97% de pureza, de peso molecular 558,70 (base anidra) e fórmula molecular $C_{32}H_{46}O_8 \cdot xH_2O$ (SIGMA-ALDRICH, 2016).

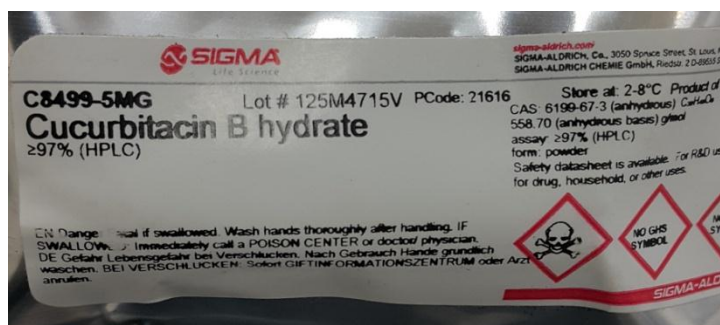


Figura 8: Padrão de Cuc B

4.7 Equipamentos

Todos os instrumentos de medição usados nas análises – termômetro digital, pipetas automáticas e balanças – são calibradas regularmente e certificadas por empresas pertencentes à Rede Brasileira de Calibração.

Para o procedimento de extração da cucurbitacina B foram utilizados:

- Balança analítica Shimadzu, modelo AY 220 com precisão de 0,1 mg (4 casas decimais);
- Balança analítica Sartorius com precisão de 0,01mg (5 casas decimais);
- Misturador vórtex (Labnet Intenational Inc.) (Figura 9);

- Shaker (Marconi, modelo FVR-C9S);
- Centrífuga (Thermo Scientific, modelo 3L-R) (Figura 10);
- Micro-Centrífuga de bancada (Nova Instruments, modelo NI 1801) (Figura 11).



Figura 9: Misturador vórtex



Figura 10: Centrífuga



Figura 11: Micro-Centrífuga de bancada

4.8 Método de análise de cucurbitacina B

4.8.1 Extração

O método de extração desenvolvido na presente pesquisa foi baseado no método QuEChERS (LEHOTAY *et al.*, 2003). O solvente escolhido para a etapa de extração foi a acetonitrila pura. Para cada extração foram utilizados 10 mL da mistura de ACN/água (70:30) em cerca de 2 g de amostras de sementes, 6 g para as amostras de sementes em pasta (respeitando dessa forma a proporção de 2:1) e cerca de 5 g para as amostras de polpa e casca. Após essa etapa foi procedida a homogeneização das amostras através do uso de um aparelho vórtex durante 1 min, seguido de agitação por 1 h em um shaker. Cada amostra então foi centrifugada a 5000 rpm por 15 min (figura 12).

4.8.2 Purificação

Para a etapa de purificação, uma alíquota de 1 mL, de cada amostra, foi transferida para um tubo de *clean up* contendo 150 mg de sulfato de magnésio, 50 mg de alumina e 50 mg de C18. Procedeu-se a homogeneização das amostras através do uso do vórtex por 1 min, seguido de centrifugação em microcentrífuga a 5000 rpm por 7 min.

Transfere-se para um vial uma alíquota purificada do sobrenadante para posterior análise por CLAE. Cada amostra foi evaporada à secura sob nitrogênio e ressuspensa com a mistura de solvente ACN/água na proporção 30:70 (figura 13).

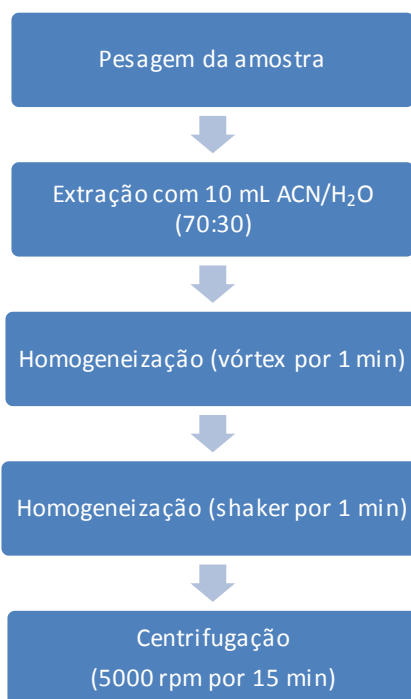


Figura 12: Fluxograma do Método de extração implantado

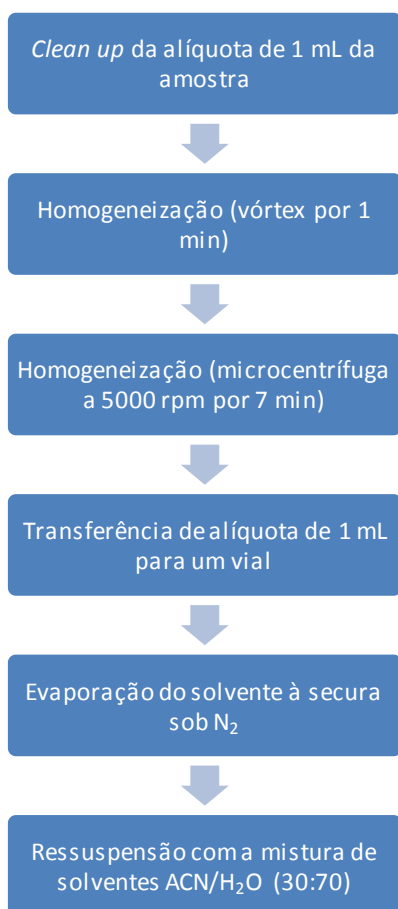


Figura 13: Fluxograma do Método de purificação implantado

4.8.3 Sistema cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento de CLAE da Shimadzu com detector de arranjo de diodos (figura 14). Este sistema consiste de uma bomba binária modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, forno de coluna modelo CTO-20A, detector de ultravioleta com arranjo de diodos (UV/DAD) modelo SPD-M20A e software LC Solution para quantificação e tratamento dos dados experimentais.



Figura 14: Equipamento de CLAE utilizado para as análises

4.8.4 Parâmetros cromatográficos

Foi utilizada uma coluna Kinetex de fase reversa C18, fabricada pela Phenomenex, com dimensões de 2,1x5 cm e partículas de 2,6 micras. A separação foi realizada em modo isocrático e a fase móvel foi constituída por acetonitrila/água (34:66) e o fluxo foi de 0,2 mL/min; a temperatura do forno do sistema CLAE foi de 50°C. A detecção foi efetuada por um detector de Ultra-violeta com Arranjo de Diodos e o comprimento de onda de detecção utilizado foi de 230 nm. O volume de injeção das amostras foi de 7 µL.

O tempo total das corridas cromatográficas foi de 30 min para cada amostra e a quantificação realizada pelo parâmetro de áreas de picos. A temperatura ambiente do laboratório foi mantida entre 20 e 24°C.

4.8.5 Cálculo da concentração de cucurbitacina B nas amostras

Após a extração, purificação e análise por cromatografia líquida, a concentração de cucurbitacina B foi calculada considerando a área do pico que elui no mesmo tempo de retenção que o padrão. Assim, a concentração final (C_{final}) é calculada através da seguinte fórmula:

$$C_{final}(x) = \frac{Área - b}{a} \times F_{dil} \times \frac{1}{m}$$

Onde “b” é o coeficiente linear, “a” é o coeficiente angular, “m” é a massa da amostra em gramas.

O fator de diluição é calculado através da seguinte relação:

$$F_{dil} = \frac{V_{solv\ ad}}{V_{aliquota}}$$

Onde “V_{solv ad}” é o volume da mistura de solventes adicionado para extração e “V_{aliquota}” é o volume de alíquota coletado para o “clean up”.

4.9 Preparo das soluções analíticas

Foi preparada, a partir do padrão de cucurbitacina B, uma solução mãe de concentração de cerca de 700 µg/mL em acetonitrila e a partir desta foi feita uma solução estoque. Ambas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, identificadas e estocadas na geladeira (0 a 4°C) até o momento de suas utilizações. As curvas de calibração para a cucurbitacina B foram lineares de 0,15 a 100,88 µg/mL.

5 Validação do método analítico

Para a validação do método os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade da faixa de trabalho, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação. Os ensaios foram realizados conforme a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (INMETRO, 2011) e da SANTE (2015).

5.1 Seletividade

É definida como a capacidade de um método mensurar exatamente uma substância na presença de outros componentes da matriz.

A seletividade é verificada pela análise comparativa dos resultados positivos obtidos com amostras fortificadas com o padrão de cucurbitacina B e os resultados obtidos do branco da amostra e dos reagentes.

5.2 Linearidade

A linearidade é definida pela capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo (faixa de trabalho) previamente determinado. Em geral, são necessários no mínimo cinco níveis de concentração para a construção da curva analítica.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada pela equação da regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2). A verificação de ausência de valores discrepantes pode ser realizada pelo teste de *Cochran* (verificação da homocedasticidade, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos). Os valores de *Cochran* são calculados pela razão da variância máxima (S^2 máxima) pelo somatório das variâncias ($\sum S^2$) dos valores das áreas que compõem as curvas:

$$Cochran = \frac{S_{máx}^2}{\sum S^2}$$

A faixa de trabalho de um método em estudo compreende o intervalo de concentrações do analito utilizado na construção da curva de calibração sendo que esta deve, obrigatoriamente, apresentar linearidade. Isto representa a faixa de concentração da curva analítica.

5.3 Ensaios de recuperação (exatidão)

A exatidão é definida como sendo a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro. É procedida com análises de amostras pelo método de adição padrão, onde quantidades conhecidas do padrão de referência são adicionadas às matrizes.

A exatidão, portanto é determinada através da porcentagem de recuperação (% *rec*) da quantidade conhecida de analito adicionada a amostra. É expressa pela razão da

concentração determinada experimentalmente (C_{exp}) e a concentração teórica (C_{teo}) correspondente, multiplicada por 100. De acordo com as diretrizes da Comunidade Européia expressas na SANTE (2015), o percentual de recuperação aceitável deve estar na faixa entre 70-120%.

$$\% \text{ rec} = \frac{C_{exp}}{C_{teo}} \times 100$$

Onde “ C_{exp} ” é a concentração determinada experimentalmente e “ C_{teo} ” é a concentração teórica adicionada.

5.4 Precisão (repetibilidade)

A precisão pode ser definida como sendo a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra. O tipo de precisão que foi considerado no presente trabalho foi a precisão intra-corrida (repetibilidade), que é a concordância entre os resultados dentro de um curto intervalo de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

A precisão do presente método analítico proposto é expressa como o coeficiente de variação (CV) das medidas realizadas de acordo com a fórmula:

$$CV = \frac{s}{X} \times 100$$

Onde “ s ” é o desvio padrão e “ X ” a concentração média determinada. O valor máximo aceitável para o CV é de até 20%.

5.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ podem ser definidos como as menores concentrações do analito que se pode, respectivamente, detectar e quantificar. Podem ser determinados levando-se em conta a relação da razão sinal/ruído. O sinal produzido em forma de pico em resposta à injeção de concentrações conhecidas de cucurbitacina B deve ser da razão de 3:1 para o LD e de 10:1 para o LQ em relação ao ruído produzido da linha base do sistema cromatográfico. Uma alternativa a este procedimento é calcular o LD e o LQ da seguinte forma:

$$LD = \frac{3s}{a} \quad LQ = \frac{10s}{a}$$

Onde “s” é o desvio padrão e “a” o coeficiente angular da curva.

6 Resultados e discussão

6.1 Avaliação da qualidade microbiológica

Para efeito de processamento e obtenção de produtos que podem vir a ser utilizados como alimentos, é imprescindível que se conheça a qualidade microbiológica desses produtos *in natura*. Assim, para as amostras de abóboras das espécies de *C. maxima* e *C. moschata*, foram feitas análises microbiológicas, como descritas na seção de Materiais e Métodos. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Resultado da análise microbiológica da *Cucurbita maxima* antes e depois da higienização

<i>Cucurbita maxima</i>		
Análises	Antes da higienização	Depois da higienização
Contagem padrão de Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	7,5 x 10 ³	7,5 x 10 ³
Contagem de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g)	<1,0 x 10 ¹ (estimado)	<1,0 x 10 ¹ (estimado)

Tabela 2: Resultado da análise microbiológica da *Cucurbita moschata* antes e depois da higienização

<i>Cucurbita moschata</i>		
Análises	Antes da higienização	Depois da higienização

Contagem padrão de		
Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g)	8,8 x 10 ⁴	2,8 x 10 ³
Contagem de fungos filamentosos e leveduras (UFC/g)	8,0 x 10 ² (estimado)	1,0 x 10 ² (estimado)

Todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e uma alta concentração de mesófilos significa que houve condições para que esses microrganismos se multiplicassem. A deterioração de alimentos pode ser ocasionada pelo crescimento desses microrganismos. A maioria apresenta níveis com valores de 10⁶ UFC/g de alimento e alimentos fermentados apresentam população microbiana de aproximadamente 10⁸ UFC/g sem, no entanto, serem considerados deteriorados e impróprios para o consumo (FRANCO, 2008).

De acordo com as tabelas 1 e 2 se pode observar que a etapa de higienização diminuiu a carga microbiana das amostras embora não tendo ocorrido uma diferença importante. Isso, portanto, indica que as amostras de abóboras já se encontravam razoavelmente limpas e a lavagem e a imersão com solução de hipoclorito, sendo esta última etapa realizada apenas com as amostras da espécie *C. maxima*, não alterou significativamente o nível dos microrganismos avaliados. Todas as amostras se encontram aptas para o consumo, dentro das recomendações aceitáveis, uma vez que o nível de microrganismos permitidos para alimentos é da ordem de 10⁶⁻⁸ UFC/g (FRANCO, 2008). Houve ausência de *Salmonella* spp. nas abóboras analisadas, o que está de acordo com a legislação.

6.2 Obtenção das farinhas das abóboras

Todas as farinhas de polpa e casca apresentam odor característico. Em geral as farinhas das amostras possuem a coloração amarelo-alaranjada com exceção para as sementes (coloração clara) e casca (coloração esverdeada) das farinhas da abóbora Tetsukabuto. As massas das farinhas obtidas são apresentadas na tabela 3. As fotos das farinhas obtidas são apresentadas nas figuras 15, 16 e 17.

Tabela 3: Massas das farinhas obtidas das cascas, polpa e sementes das abóboras

Amostras	Peso <i>in natura</i> (Kg)	Massa seca das farinhas		
		Semente (g)	Casca (g)	Polpa (g)
Híbrido Tetsukabuto	10,655	75,4	490,1	1202,3
<i>Cucurbita moschata</i>	12,920	174,3	166,1	1340,1
<i>Cucurbita maxima</i>	7,703	180,6	72,8	230,0

Sementes	Nº de sementes	Massa seca das farinhas das sementes (g) (Embrapa-SE)
S1	200	36,6325
S2	100	20,2643
S8	100	12,9468
XD-S	50	8,8042



Figura 15: Farinhas das cascas, polpa e sementes da abóbora Tetsukabuto



Figura 16: Farinha das cascas, polpa e sementes da abóbora *C. moschata*



Figura 17: Farinha das cascas, polpas e sementes da abóbora *C. máxima*

6.3 Desenvolvimento do método analítico

6.3.1 Determinação do método de extração

Foram testados diversos solventes para a extração (acetato de etila, metanol e acetonitrila pura) sendo o que apresentou melhores resultados para a visualização do pico do analito sem muitas interferências foi a mistura de ACN/água (70:30). Durante os primeiros experimentos foi adotada a adição de sais de sulfato de magnésio e de cloreto de sódio após a adição do solvente de extração na amostra seguindo os princípios do método QuEChERS (LEHOTAY *et al.*, 2003), pois objetivava-se o particionamento líquido-líquido formado pela adição desses sais. Ao longo da evolução das práticas essa etapa deixou de ser empregada pelo fato de se tornar muito difícil a coleta de alíquota para as etapas posteriores do preparo das amostras, pois esses sais retiam quase todo o sobrenadante. Portanto o método de extração implementado foi inspirado no método QuEChERS mas não segue à risca todos os princípios do mesmo.

Para a etapa de purificação (“clean up”) foi empregada a mistura dos sais de sulfato de magnésio, C18 e alumina. Esses sais foram escolhidos em ensaios específicos no começo do estudo. A etapa de purificação remove efetivamente diversos coextrativos do extrato orgânico como componentes polares oriundos da matriz, os ácidos orgânicos, certos pigmentos polares e açúcares (LEHOTAY *et al.*, 2003). Esta técnica de purificação é prática e eficiente na limpeza de extratos de diferentes amostras complexas de origem vegetal ou animal (CABRERA *et al.*, 2012).

Após a transferência da alíquota purificada ao vial para a análise por CLAE foi decidido evaporar a amostra à secura sob nitrogênio (N₂) e ressuspender quase na mesma proporção (um pouco mais fraco, pois apresenta menor proporção do componente orgânico) do solvente utilizado como fase móvel a fim de impedir o aparecimento de bandas que possam interferir na visualização do cromatograma.

6.3.2 Definição dos parâmetros cromatográficos

A coluna cromatográfica utilizada possui um diâmetro de 2,1 mm, com partículas da fase estacionária de 2,6 µm. Estas partículas são homogêneas com tamanho e forma bem regulares e, portanto, permitem que o processo cromatográfico se desenvolva devido à grande área superficial das partículas e melhor compactação da fase. Essa coluna é de U-HPLC e, por possuir um menor diâmetro, proporciona uma maior resolução em

comparação com as colunas convencionais de HPLC. O uso de partículas menores que permite melhor resolução poderia implicar em um aumento de pressão. Contudo isso não ocorre já que as colunas empregadas possuem um comprimento menor (100 mm) que as de HPLC mais comuns.

O fluxo e o volume de injeção foram ajustados para 0,2 mL/min e 7 μ L, respectivamente. Um volume de injeção menor evita a saturação da fase estacionária e a sobrecarga da coluna cromatográfica. A pressão do sistema cromatográfico, a qual é medida na cabeça da coluna, permaneceu em torno de 1800 psi. A temperatura do forno inicialmente ajustada em 40°C, foi alterada para 50°C, pois quanto maior a temperatura aplicada menor será a pressão devido a redução da viscosidade da fase móvel. Contudo, uma temperatura alta demais pode ser prejudicial para o sistema e provocar alterações nas amostras.

O comprimento de onda selecionado para o método foi de 230 nm. A escolha desse comprimento de onda foi baseada no fato deste promover a visualização do pico de cucurbitacina sem a presença de bandas interferentes que poderiam dificultar a observação do analito (KREPSKY *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2012; HORIE *et al.*, 2007; KAYA; MELZIG, 2008; SEGER *et al.*, 2004). Para o ajuste da fase móvel (FM) foram realizados experimentos com diferentes proporções com o objetivo de se obter um tempo de retenção (t_r) do analito adequado, isto é, pelo menos duas vezes superior ao fator de capacidade (k). Isto significa que o tempo de retenção do analito, a cucurbitacina B, deve ser de pelo menos duas vezes o volume morto do sistema.

Uma análise de cucurbitacina B no sistema CLAE/UV utilizando a FM na proporção de 38:62 (acetonitrila/água) gerou um pico com t_r de cerca de 2,9 min com um formato não simétrico, como é mostrado na figura 18.

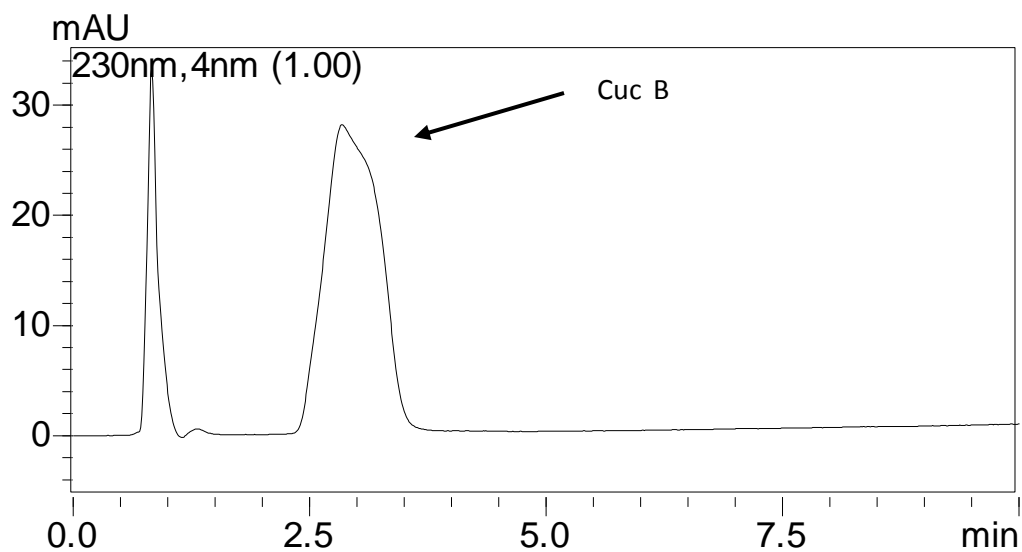


Figura 18: Cromatograma com a FM 38:62 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 $\mu\text{g/mL}$

Outra análise de cucurbitacina B no sistema CLAE/UV utilizando a FM na proporção de 30:70 (acetonitrila/água) gerou um pico com tr de cerca de 8,0 min com um formato não simétrico, em forma de “banco” e dividido mostrado na Figura 19.

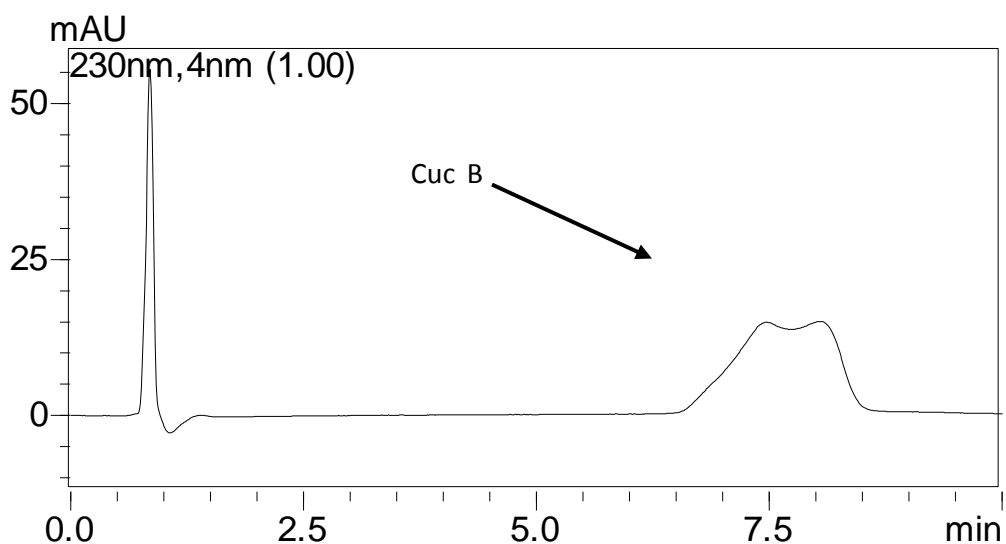


Figura 19: Cromatograma com a FM 30:70 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 $\mu\text{g/mL}$

Como foi observado um “split” do pico e um tempo de retenção por volta de 8 min. Isto não foi considerado aceitável para esta análise sendo necessário, portanto, alguns ajustes. Desta forma, a polaridade da FM foi alterada para torná-la mais “forte” (> % orgânico) para diminuir a retenção do analito. Além disso, o solvente de dissolução da amostra após o *clean up* foi trocado para deixá-lo mais “fraco” que a própria FM, evitando distorções no formato. Foi escolhida, portanto, como FM ideal a proporção de 34:66 (acetonitrila/água), pois resultou em um pico com tr de cerca de 4,8 min com um formato simétrico e com um tempo de retenção do analito adequado (figura 20). O solvente da amostra (30:70) é mais fraco, ou seja, menor proporção do componente orgânico, do que a FM. O uso desta proporção na mistura para solubilizar os extratos das amostras e padrões, permitiu a obtenção de picos simétricos e bem definidos.

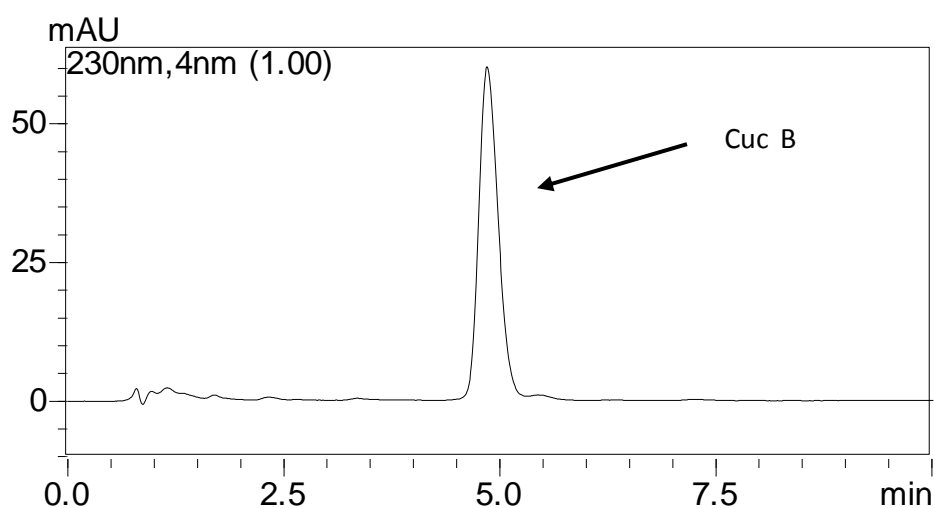


Figura 20: Cromatograma com a FM 34:66 ACN:água e padrão de Cuc B com concentração de 30,264 µg/mL

6.4 Validação do método de cucurbitacina B

6.4.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter interferentes nas respostas das medições. Tais respostas podem aumentar ou reduzir o sinal, sendo que a magnitude do efeito também pode depender da concentração. A seletividade foi verificada pela análise comparativa dos resultados positivos obtidos com amostras fortificadas com o padrão de cucurbitacina B e os resultados obtidos do branco da amostra e dos reagentes.

A figura 22 mostra o cromatograma parcial do extrato de semente da abóbora Tetsukabuto fortificado obtido no sistema CLAE-UV/DAD. O pico de Cuc B elui sem problemas e apresenta simetria no tempo de retenção de 4,9 min. Vale ressaltar que não foi detectada a presença de cucurbitacinas nas sementes das abóboras Tetsukabuto quando estas não eram fortificadas (figura 21). Nas figuras 23 e 24 estão expostos, respectivamente, os cromatogramas total e parcial do branco de reagentes.

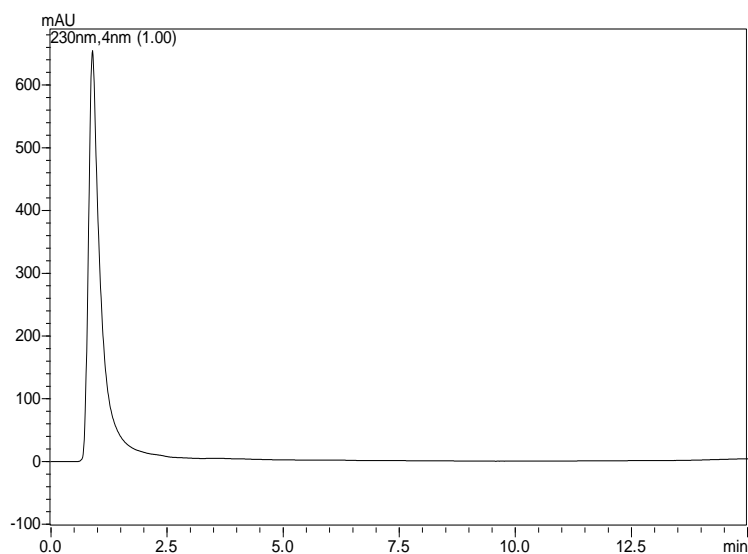


Figura 21: Cromatograma total do branco da amostra (extrato de sementes da Tetsukabuto)

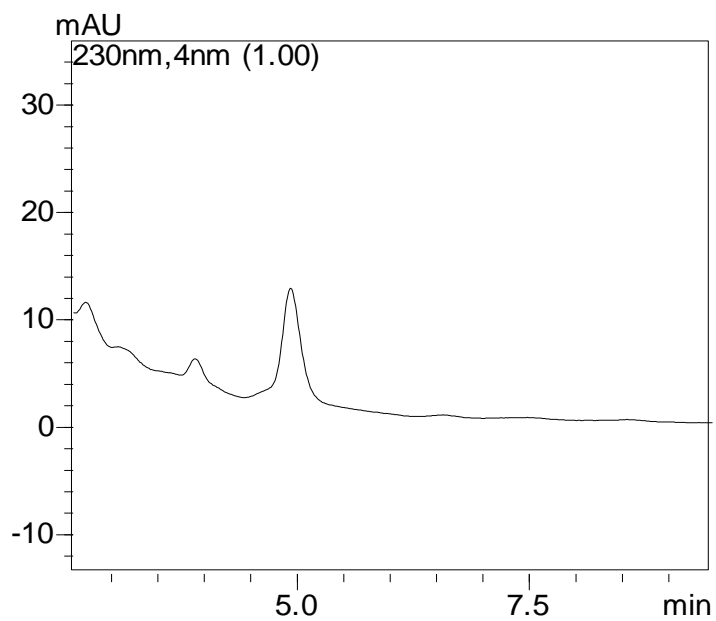


Figura 22: Cromatograma parcial do Extrato de semente (Tetsukabuto) fortificada com 50 μL da solução mãe (756,60 $\mu\text{g/mL}$)

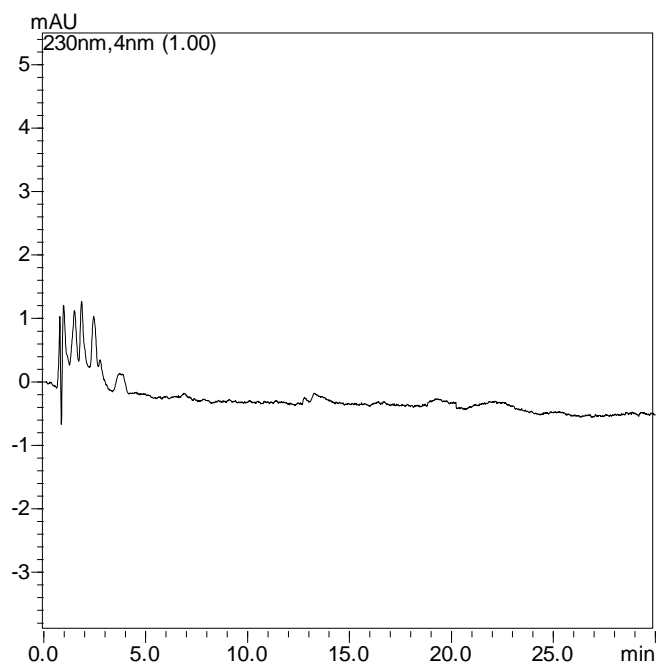


Figura 23: Cromatograma total do Branco de reagente

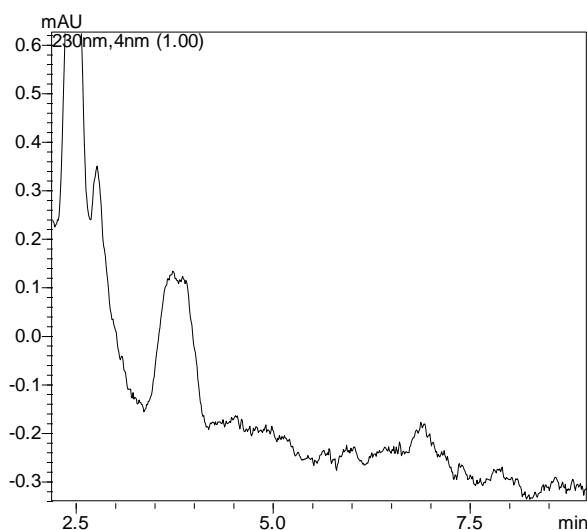


Figura 24: Cromatograma parcial do Branco de reagente (escala aumentada)

Visualizando os cromatogramas das figuras 21 e 24, observa-se com clareza que não existem interferências da matriz e a presença de pico na região onde elui a cucurbitacina B, isto é, no tempo de retenção de cerca de 5 min.

Cabe também mencionar que o comprimento de onda no UV selecionado foi de 230 nm, comprimento este específico para a Cuc B. O solvente de extração utilizado foi a mistura ACN/água (70:30). Foi realizado o mesmo procedimento do tratamento das amostras para a análise por CLAE. Após a etapa de “clean up” o solvente de extração foi evaporado sob N₂ e a amostra foi ressuspensa na mistura ACN/água na proporção de 30:70.

Os cromatogramas dos brancos da amostra e dos reagentes não demonstraram nenhuma resposta no tempo de retenção de cerca de 5 min, tempo este do Cuc B. Pode-se concluir que não há interferência das amostras nesta região do cromatograma evidenciando a seletividade do método nessas condições.

6.4.2 Linearidade

As faixas de trabalho das curvas analíticas construídas consideraram dados da literatura e também a sensibilidade do equipamento utilizado.

Os trabalhos consultados empregaram concentrações relativamente altas para as suas faixas de trabalho: 4,00 a 240 µg/mL (KREPSKY *et al.*, 2009); 15,7 a 250 µg/mL (KAYA; MELZIG, 2008). Contudo, para a presente pesquisa foram utilizadas

concentrações menores devido à boa sensibilidade do sistema cromatográfico usado. Deve ser ressaltado o fato de se ter tido dificuldades com a quantidade de padrão de cucurbitacina B disponível para o desenvolvimento do presente estudo. Este padrão é caro, importado e de difícil obtenção.

Como descrito no item 4.9, para a construção das curvas analíticas, foram preparadas soluções mãe de concentrações de cerca de 700 µg/mL em acetonitrila e a partir destas foram feitas soluções estoque. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar, identificadas e estocadas na geladeira (0 a 4°C) até o momento de suas utilizações.

Foram construídas mais de 30 curvas analíticas com cucurbitacina B usando diferentes faixas de concentração. As curvas de calibração de CucB demonstraram possuir linearidade em diferentes faixas de trabalho estudadas, abrangendo de 0,15 a 100,88 µg/mL. Dentro desse intervalo de linearidade foram construídas curvas para os cálculos das concentrações e recuperações. Tais curvas abrangeram de 2,269 a 41,613 µg/mL e de 0,154 a 17,278 µg/mL.

A linearidade dessas curvas foi verificada pelas equações de regressão linear e pelos coeficientes de determinação (R^2), encontrada através do método dos mínimos quadrados utilizando o programa Excel da Microsoft Office 2007. Todas as curvas utilizadas apresentaram o R^2 acima do recomendado (0,95).

Para a verificação de ausência de valores discrepantes foi realizada através do teste de *Cochran* que comprova a homocedasticidade, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos. Os valores de *Cochran* foram calculados pela razão da variância máxima pelo somatório das variâncias dos valores das áreas que compõem as curvas. Os valores calculados foram comparados com os valores críticos para esse teste no nível de significância de 5% (Anexo 1).

Para as curvas serem validadas por este teste as mesmas devem, portanto, apresentar o valor calculado menor que o valor tabelado do respectivo n e k . O n significa o nº de repetições, ou seja, o nº de medidas em cada nível do fator (nº de curvas empregadas para o cálculo). O k significa o nº de níveis (nº de concentrações que compõem cada curva de calibração).

Todas as curvas utilizadas para os cálculos de concentração e recuperação de cucurbitacina B foram validadas por esse método e são mostradas nas figuras 25 a 29.

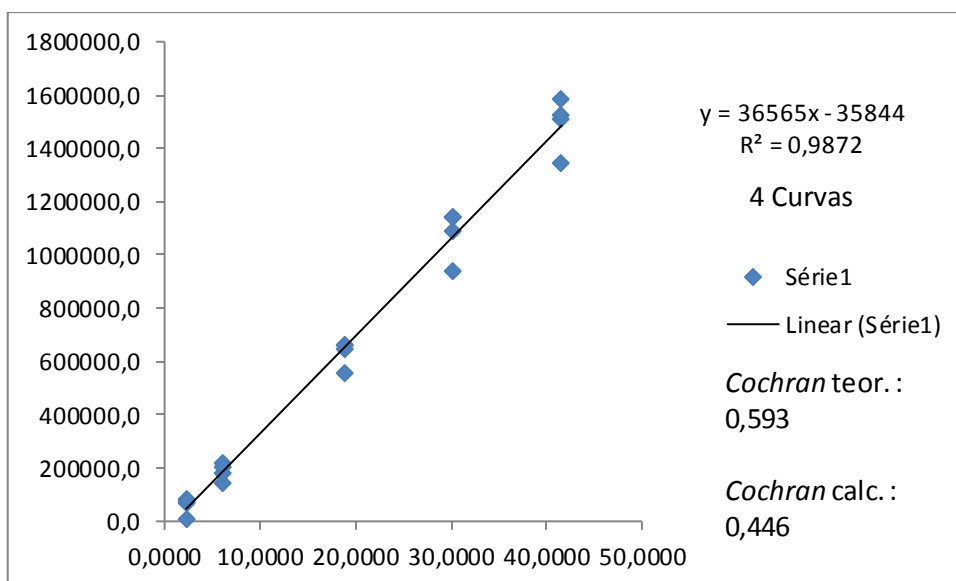


Figura 25: Curva analítica 1, utilizada para o cálculo do ensaio de recuperação das sementes da abóbora japonesa fortificadas com 100 μL de solução mãe (756,60 $\mu\text{g/mL}$). Nível 1 de fortificação (37,83 $\mu\text{g/g}$).

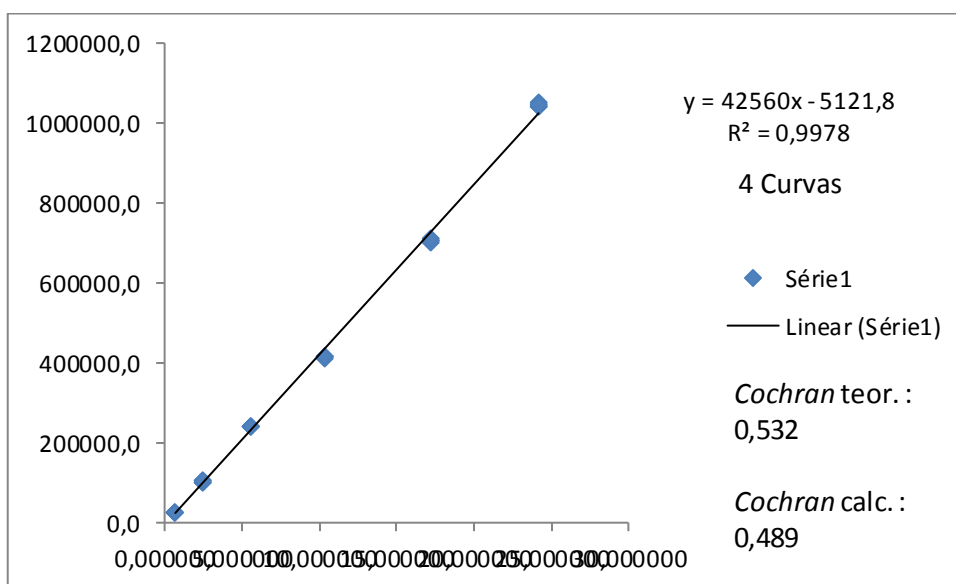


Figura 26: Curva analítica 2, utilizada para o cálculo do ensaio de recuperação das sementes da abóbora japonesa fortificadas com 50 μL de solução mãe (756,60 $\mu\text{g/mL}$). Nível 2 de fortificação (25,22 $\mu\text{g/g}$).

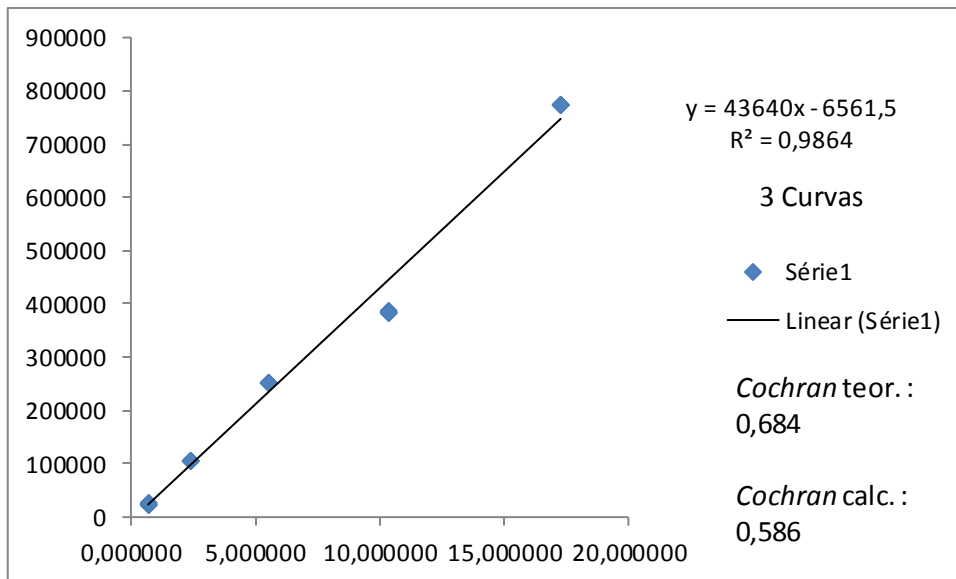


Figura 27: Curva analítica 3, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes de abóbora em pasta com a genética conhecida

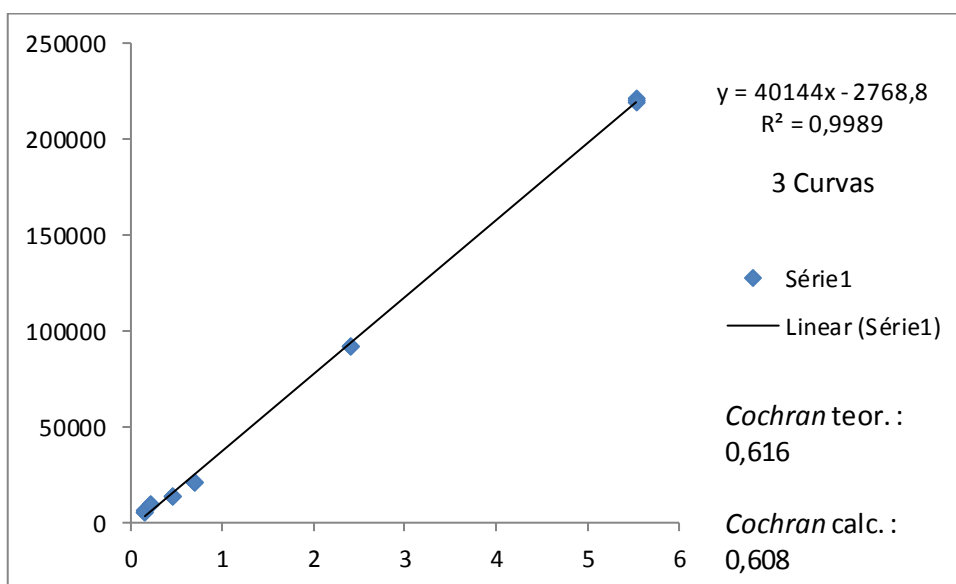


Figura 28: Curva analítica 4, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes moídas de abóbora com a genética conhecida

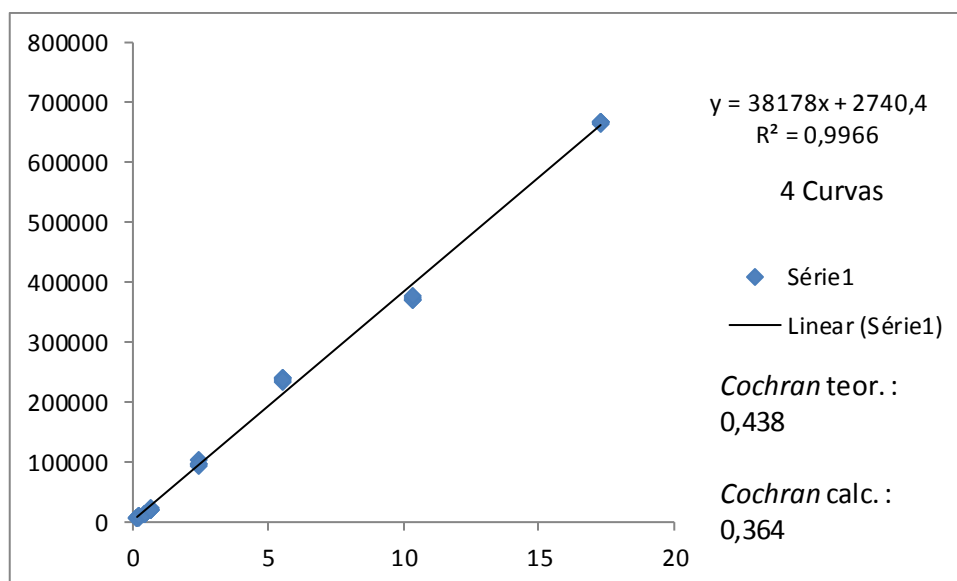


Figura 29: Curva analítica 5, utilizada para o cálculo da concentração de cucurbitacina B das sementes, polpas e cascas das *C. maxima* e *C. moschata*

6.4.3 Ensaio das recuperações e da repetibilidade

Foram realizados ensaios de recuperação do padrão de cucurbitacina B para dois níveis de fortificação para as sementes e um nível para a polpa. Para os ensaios de recuperação foram escolhidas como amostra as sementes de abóbora japonesa (Tetsukabuto), pois é um híbrido resultante do cruzamento da *Cucurbita maxima* com a *Cucurbita moschata*. As abóboras japonesas, portanto, possuem características de ambas as espécies. Esses ensaios são importantes para se avaliar o efeito da matriz. Substâncias inerentes da matriz podem prejudicar na avaliação da presença do analito de interesse.

Como descrito na seção de materiais e métodos as recuperações são determinadas através do cálculo da porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de analito adicionada à amostra. É expressa pela razão da concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicada por 100.

Não foi possível obter a recuperação adequada para as cascas, pois os seus valores percentuais de recuperação oscilavam muito (de 84,70 a 226,7%). Essa análise foi realizada em triplicata. Portanto, não é preconizado o uso do método proposto para a análise das cascas.

As recuperações obtidas (tabelas 4 e 5) se encontram na faixa percentual de 70-120%, de acordo com as diretrizes da SANTE (2015).

Tabela 4: Percentual das recuperações das Farinhas de sementes do híbrido Tetsukabuto

Equação da curva	Área do pico	Percentagem de recuperação
Nível de fortificação de 37,83 µg/g		
$y = 36565x - 35844$	178.456,3	77,46%
	180.136,7	78,07%
	176.433,9	76,73%
Nível de fortificação de 25,22 µg/g		
$y = 42560x - 5121,8$	116.274,5	75,40%
	114.967,6	74,59%
	118.834,4	76,99%

Tabela 5: Percentual das recuperações das Farinhas da polpa do híbrido Tetsukabuto

Equação da curva	Área do pico	Percentagem de recuperação
Nível de fortificação de 5,18 µg/g		
$y = 38178x + 2740,4$	30021,2	89,61%
	31396,2	94,12%
	31381,6	94,08%
	28422,8	84,36%

O critério da escolha de diferentes curvas para cada nível de fortificação foi feito de acordo com a proximidade das datas dos experimentos de fortificação com as curvas de calibração construídas.

O nível de precisão considerado é relacionado à repetibilidade. Esse é analisado entre uma corrida e outra. Por isso é chamado também de precisão intracorrida. A precisão foi determinada em dois níveis de adição do padrão de cucurbitacina B para as sementes e em um nível para a polpa. Para as sementes, em cada nível, foram realizados ensaios em triplicata. Para a polpa foram realizados quatro ensaios para um nível de adição de padrão. Os resultados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6: Coeficientes de Variação dos percentuais das recuperações das Farinhas de sementes e polpas do híbrido Tetsukabuto

Nível de fortificação	Média da recuperação (X)	Desvio Padrão (s)	Coeficiente de Variação (CV)
Sementes			
37,83 µg/g	77,42 %	0,67	0,86 %
25,22 µg/g	75,66 %	1,22	1,61 %
Polpa			
5,18 µg/g	90,54 %	4,63	5,12 %

É observado que os valores de coeficientes de variação encontram-se bem abaixo do valor máximo aceitável, que é de 20% (SANTE, 2015). Portanto o método proposto possui uma boa repetibilidade. Cerca de um mês após a realização desses experimentos foi feito mais uma recuperação para a semente (nível de fortificação de 1,72 µg/g). O resultado percentual foi de 77 % o que assegura a confiabilidade do método.

6.4.4 Determinação dos LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação de métodos analíticos para investigação de uma determinada substância são fundamentais para o estabelecimento da capacidade analítica na avaliação qualitativa e quantitativa de amostras.

Os limites de detecção e de quantificação de um método são as menores concentrações do analito de interesse que é possível detectar e quantificar, respectivamente pelo sistema CLAE empregado. Na presente pesquisa os LD e LQ foram calculados através da relação matemática $LD = 3s/a$ e $LQ = 10s/a$ onde “s” é o desvio calculado a partir do primeiro nível da curva analítica utilizada e “a” é o coeficiente angular da equação da reta dessa mesma curva para a determinação desse limite.

Considerando as cinco curvas analíticas utilizadas para os ensaios analíticos do trabalho e o ponto de menor de concentração que é de 0,154 µg/mL, os limites de detecção e quantificação instrumentais calculados foram de 0,120 e 0,397 µg/mL, respectivamente.

Para calcular os limites do método é preciso considerar toda a análise, extração e “clean up”. Assim, a partir dos limites instrumentais encontrados, é preciso calcular os valores que correspondam aos limites na matriz avaliada. Para isso devem-se aplicar estes valores na fórmula do cálculo de concentração de cucurbitacina para obtenção do LQ do método. Assim, o limite de detecção do método foi de 0,602 µg/g e o de quantificação foi de 1,985 µg/g de amostra.

Os quadros 1, 2 e 3 que se seguem apresentam o resumo de todos os resultados relativos à validação.

Quadro 1: Valores das curvas analíticas

Cuc					
B					
Curvas	1	2	3	4	5
R ²	0,9872	0,9978	0,9864	0,9989	0,9966
Equação	y = 36565x – 35844	y = 42560x – 5121,8	y = 43640x – 6561,5	y = 40144x – 2768,8	y = 38178x + 2740,4
Coeficiente angular (a)	36565	42560	43640	40144	38178
Coeficiente linear (b)	35844	5121,8	6561,5	2768,8	2740,4
Faixa de trabalho (µg/mL)	2,269 a 41,613	0,691 a 24,189	0,691 a 17,278	0,154 a 5,529	0,154 a 17,278
<i>Cochran</i> teórico	0,593	0,532	0,684	0,616	0,438
<i>Cochran</i> calculado	0,446	0,489	0,586	0,608	0,364

Quadro 2: Valores percentuais das recuperações e seus respectivos coeficientes de variação

Porcentagem de recuperação	Coefficiente de Variação (CV)
77,46%	0,86%
78,07%	
76,73%	
75,40%	1,61%
74,59%	
76,99%	
89,61%	5,12 %
94,12%	
94,08%	
84,36%	

Quadro 3: Limites do método

Limites do método	Limite de detecção	Limite de quantificação
Instrumentais ($\mu\text{g/mL}$)	0,120	0,397
Na matriz avaliada ($\mu\text{g/g}$)	0,602	1,985

6.5 Avaliação das amostras

As sementes das abóboras desenvolvidas pela Embrapa avaliadas possuem uma genética conhecida. Isto quer dizer, na verdade, que suas características fenotípicas são conhecidas e associadas ao seu genótipo. Isto é importante, pois é de conhecimento que a produção de cucurbitacinas está associada aos genes da planta.

6.6 Resultados das concentrações de Cuc B das sementes da Embrapa

Com o método proposto e validado do presente trabalho foram determinadas as concentrações de Cuc B nas amostras de sementes de abóbora que possuem a sua genética conhecida, cedidas pela unidade Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe. Os

resultados obtidos das análises de Cuc B para a farinha das sementes estão nas tabelas 7 e 8.

No momento das análises, foi observado que as amostras não se apresentavam totalmente homogêneas, com a formação de pequenos grumos. Para contornar este problema, as amostras foram pré-tratadas, isto é, foram feitas pastas com adição de água na proporção de 2:1. Dessa forma as amostras ficaram homogêneas o suficiente para a os procedimentos de extração e análise. Essa solução foi sugerida pelos membros do Laboratório de Resíduos e Contaminantes, pois esse artifício é bastante utilizado em amostras de sementes de diversas espécies e plantas.

Os valores encontrados para as pastas correspondem à massa de 2 g de sementes para cada amostra. Para essas pastas foram pesadas, para cada amostra, cerca de 6 g levando em consideração o conteúdo de umidade adicionado.

Tabela 7: Concentração de Cuc B das sementes em pasta da Embrapa

Sementes (Pasta)	Concentração de Cuc B ($\mu\text{g/g}$ de semente)
S1	3,206
S2	6,006
S8	7,081
S-XD	6,314

Foi decidido, para fins de comparação dos resultados, repetir a análise das amostras dessas sementes sem a conversão das mesmas em pasta. Assim, uma nova análise, usando apenas a farinha moída das sementes foi efetuada. Os resultados dessa análise se encontram na tabela 8.

Tabela 8: Concentração de Cuc B das sementes moídas da Embrapa

Sementes (Moída)	Concentração de Cuc B ($\mu\text{g/g}$ de semente)
S1	1,478
S2	1,959

S8	2,252
S-XD	6,159

Comparando os resultados obtidos pelas duas formas de tratamento das amostras, vemos que no caso das amostras com maior homogeneidade (em pastas) todos os resultados foram maiores. Apenas uma das amostras, a denominada de S-XD teve valores equivalentes de concentração de Cuc B. A tabela 9 abaixo apresenta as médias das sementes em pastas e moídas.

Tabela 9: Valores médios das concentrações das sementes em pastas e moídas

Sementes	Valor médio da Concentração de Cuc B ($\mu\text{g/g}$ de semente)
Pastas	5,652
Moídas	2,962

Isto permite dizer que a homogeneidade da amostra é um ponto crucial para obtenção de melhores resultados.

As avaliações das farinhas de sementes das amostras adquiridas no mercado varejista apresentaram os seguintes valores expostos na tabela 10.

Tabela 10: Concentração de Cuc B das sementes adquiridas no mercado varejista

Sementes	Concentração de Cuc B ($\mu\text{g/g}$ de semente)
<i>C. moschata</i>	0,752
<i>C. maxima</i>	ND

As sementes das abóboras da espécie *C. maxima* não apresentaram Cuc B. Pode se observar que as sementes oriundas da Embrapa de Sergipe possuem maior teor de Cuc B do que as sementes das abóboras que são encontradas no mercado varejista.

A genética das sementes da Embrapa que define suas características é conhecida. Isso significa que algumas características genóticas e fenotípicas das abóboras já permitiam supor a presença e concentração maior de cucurbitacina B nessas sementes.

6.7 Resultados das concentrações de Cuc B das amostras adquiridas no comércio varejista

Após a recuperação das sementes das abóboras híbridas japonesas foram realizadas análises de recuperação de polpa e casca desse híbrido (cerca de 5g de amostra para cada experimento). Os resultados para as recuperações da casca variaram muito, com valores de até 250%. Segundo a observação experimental por cromatogramas existem componentes inerentes das matrizes que interferem na visualização e quantificação do pico. Assim, o método empregado para a recuperação de polpa e casca não forneceu resultados adequados. Uma alteração no método, portanto, se fez necessária para a análise de recuperação de polpa e casca desse híbrido.

Foram realizados ensaios de recuperação para a polpa e casca com cerca de 2g de amostra para cada experimento, visando diminuir o efeito ocasionado pela matriz. As recuperações obtidas para a polpa ficaram dentro da faixa estabelecida pelas exigências da SANTE (2015). Quanto às cascas não foram possíveis a obtenção de valores de recuperação adequados.

Não foram detectados a presença de Cuc B nas amostras comerciais de polpa e cascas das espécies *C. maxima* e *C. moschata*, com exceção da casca da *C. moschata* que apresentou o valor de concentração de Cuc B de 6,389 µg/g. Porém, não é preconizado o uso do método implantado para as análises das cascas, uma vez que não foi possível obter valores de recuperação adequados para as mesmas.

6.8 Avaliação de cucurbitacina B nas amostras de campo

Para o estudo da comprovação da presença de cucurbitacina B de algumas amostras são demonstrados abaixo dois cromatogramas com o objetivo de comparar os tempos de retenção da cucurbitacina B de uma amostra com as de uma solução padrão.

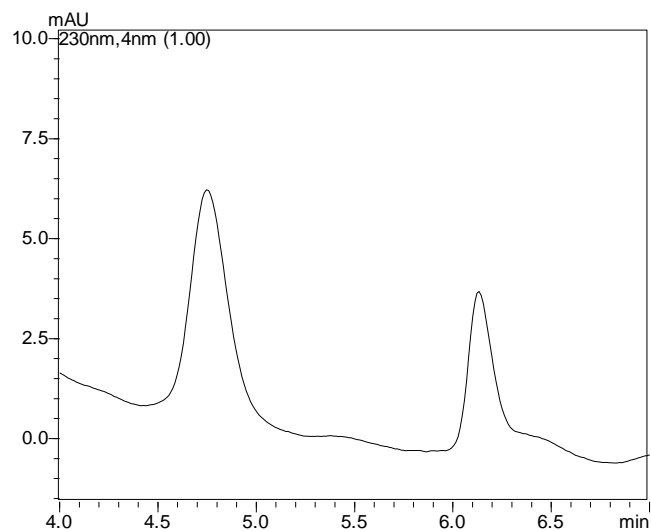


Figura 30: Cromatograma parcial do extrato da casca de *C. moschata*

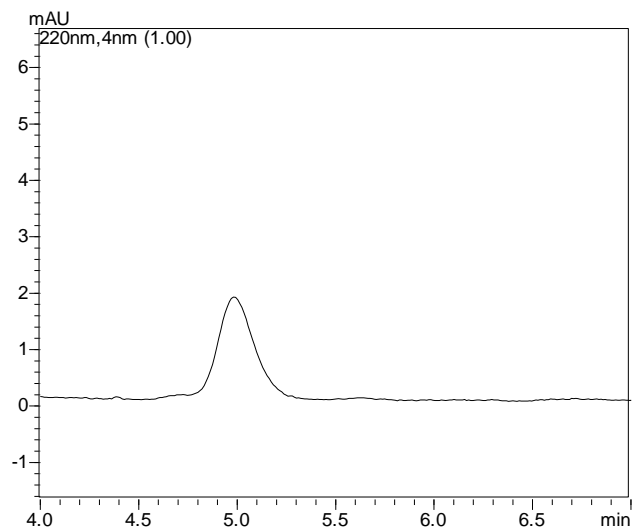


Figura 31: Cromatograma parcial da solução padrão de concentração 0,691 $\mu\text{g/mL}$

Comparando o cromatograma da figura 30 com a da 31 é observado que há uma diferença, embora pequena, entre os tempos de retenção da substância detectada pelo sistema CLAE (~4,7 min) (na amostra do extrato da casca de *C. moschata*) e da cucurbitacina B (~5,0 min) (na amostra da solução padrão).

Para se ter a confiabilidade que o pico que foi visualizado refere-se ao analito de interesse foi realizado outro teste. Foi feita a coinjeção (figuras 32 e 33) do extrato de semente de *C. moschata* com solução padrão. O objetivo é confirmar se o tempo de retenção da Cuc B dessa amostra coincide com a da solução padrão.

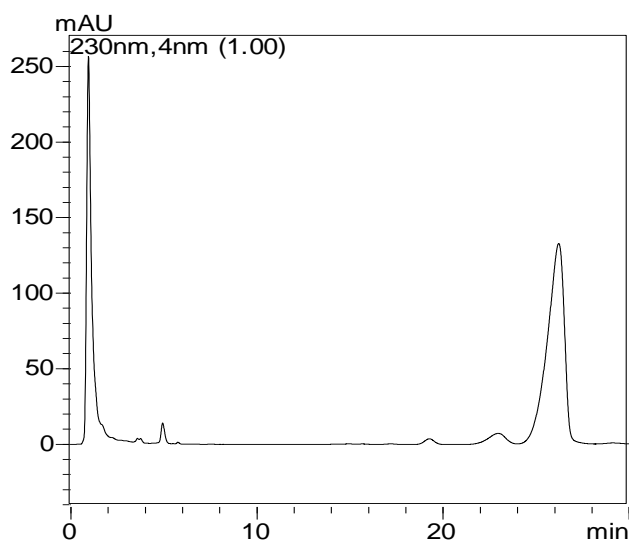


Figura 32: Cromatograma do extrato de semente de *C. moschata* coinjetada com solução do padrão (10,366 µg/mL)

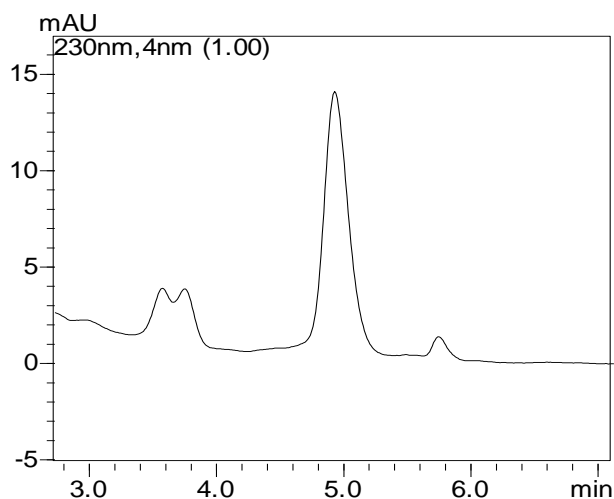


Figura 33: Cromatograma parcial do extrato de semente de *C. moschata* coinjectada com solução do padrão (10,366 $\mu\text{g/mL}$) (escala aumentada)

Analisando os cromatogramas das figuras 32 e 33 se pode afirmar, com certo grau de segurança, que o pico do extrato de semente de *C. moschata* refere-se a cucurbitacina B, ou seja, a mesma substância detectada pelo CLAE na solução padrão (tr de cerca de 5 min).

Diversos cromatogramas que se seguem abaixo mostram o tr de Cuc B (~5min) sem nenhum pico. Observam-se outros picos que possivelmente podem ser esqueletos triterpênicos similares ao do Cuc B, pois saem próximos ao tr do mesmo em 230 nm:

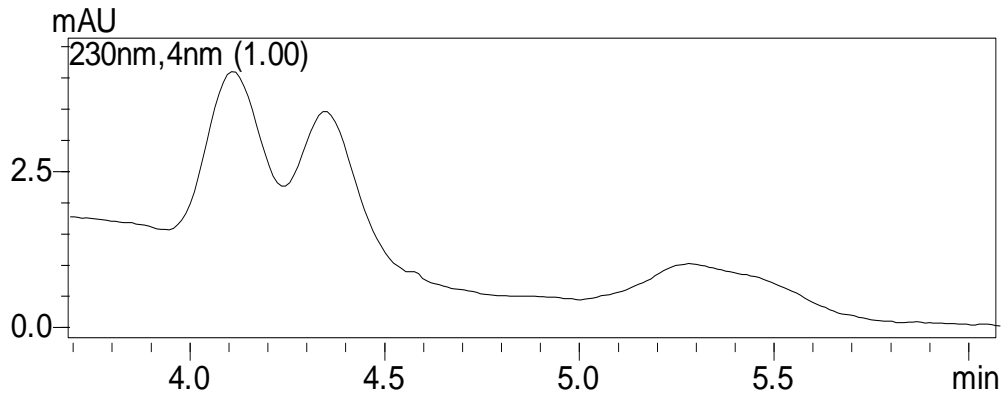


Figura 34: Cromatograma parcial do extrato de sementes da *C. maxima*

De acordo com o cromatograma da figura 34 e com o resultado enunciado no início dessa seção as sementes da espécie *C. maxima* não possuem cucurbitacina B.

O cromatograma da figura 35 abaixo mostra o pico de cucurbitacina B em uma das amostras da polpa do híbrido japonês fortificada.

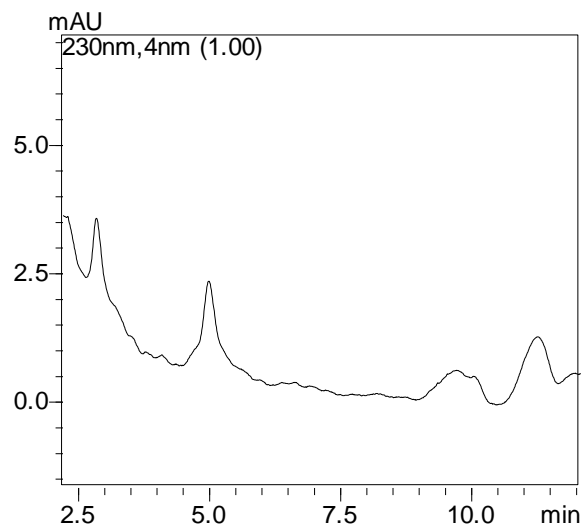


Figura 35: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês fortificada com 10,366 µg

No cromatograma da figura 36, do extrato da polpa do híbrido japonês não fortificado, é observado um pico muito largo, possivelmente indicando substâncias interferentes inerentes da matriz da polpa.

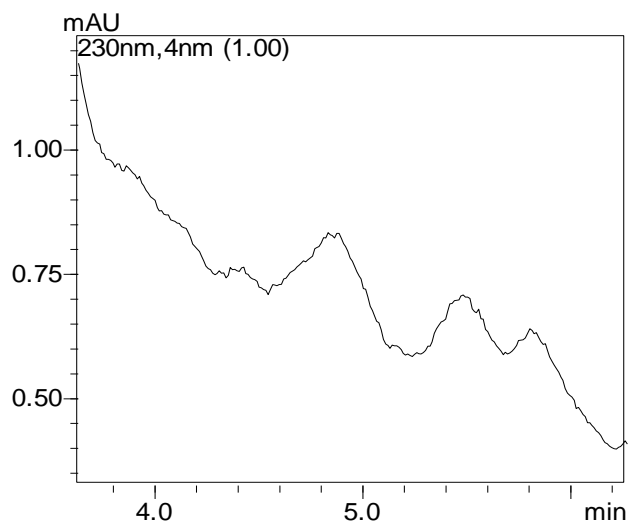


Figura 36: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês

Foi realizada uma replicata desse ensaio (figura 37), do extrato da polpa do híbrido japonês não fortificado, empregando as mesmas condições:

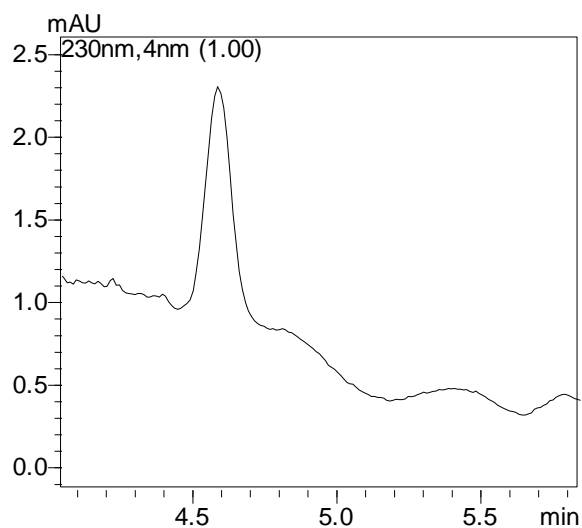


Figura 37: Cromatograma parcial do extrato da polpa do híbrido japonês

Foram também analisados pelo sistema CLAE os extratos das polpas de *C. maxima* e *C. moschata*:

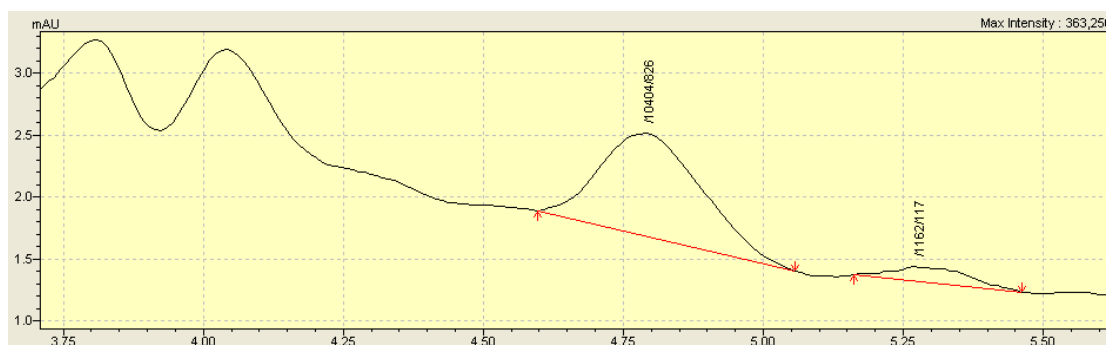


Figura 38: Cromatograma parcial do extrato da polpa de *C. maxima*

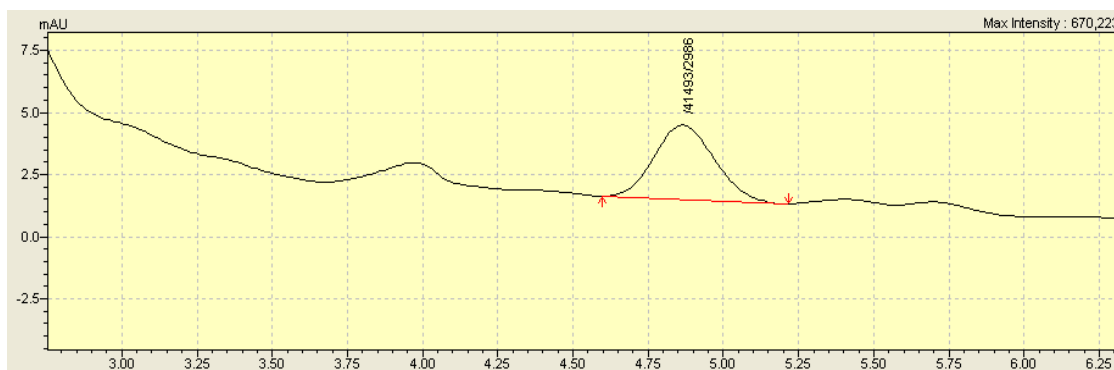


Figura 39: Cromatograma parcial do extrato da polpa da *C. moschata*

Pelos cromatogramas das figuras 37, 38 e 39 é observada a presença de um pico em tempos de retenção próximos ao do padrão de Cuc B (~5 min). Isso significa que, possivelmente, sejam substâncias triterpênicas que apresentam características estruturais semelhantes a da cucurbitacina B.

O cromatograma parcial do extrato da casca do híbrido japonês fortificada com 10,366 µg (figura 40) embora mostre a presença do pico no tempo de retenção da cucurbitacina B (~5 min), não foi possível ser usado para obter a validação para essas cascas, pois os seus valores percentuais de recuperação oscilavam muito. Portanto, o método proposto não se mostra adequado para as cascas.

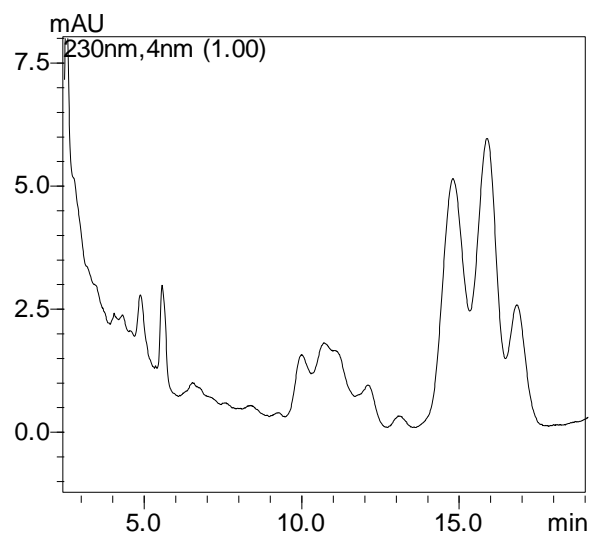


Figura 40: Cromatograma parcial do extrato da casca do híbrido japonês fortificada com 10,366 μg

Foram também analisados pelo sistema CLAE os extratos das cascas de *C. maxima* e *C. moschata*, e os resultados são mostrados nas figuras 41 e 42.

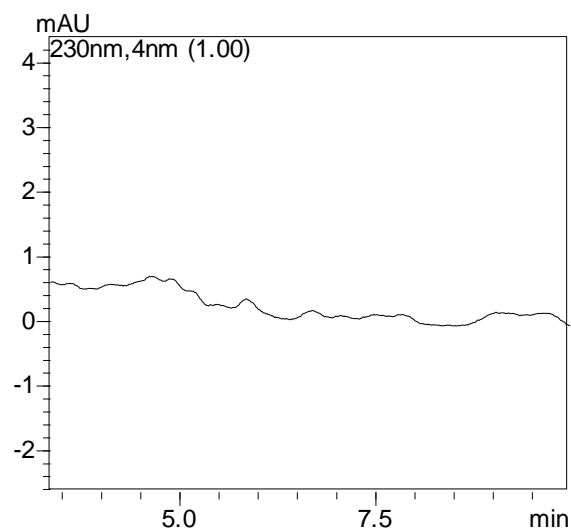


Figura 41: Cromatograma parcial do extrato da casca da *C. maxima*

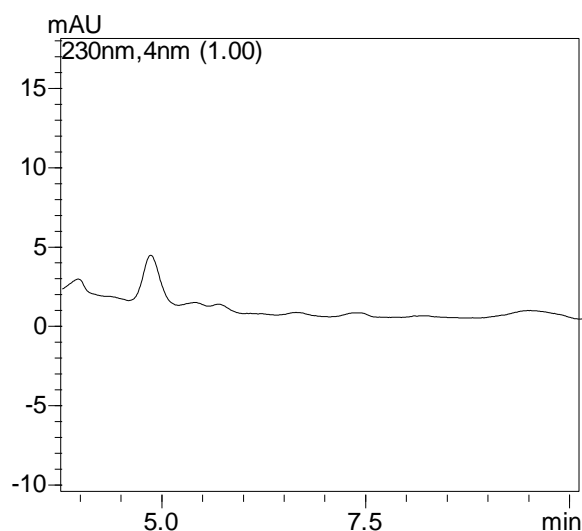


Figura 42: Cromatograma parcial do extrato da casca da *C. moschata*

Conforme já enunciado não foi detectada a presença de Cuc B nas amostras comerciais de polpa e cascas das espécies *C. maxima* e *C. moschata*, com exceção da casca da *C. moschata* que apresentou o valor de concentração de Cuc B de 6,389 µg/g. Porém, não é preconizado o uso do método implantado para as análises das cascas, uma vez que não foi possível validá-lo para esse tipo de matriz.

Os trabalhos existentes na literatura iniciam com a extração e isolamento dos padrões seguido de análise de cucurbitacinas em algumas amostras (KREPSKY *et al.*, 2009; DELAZAR *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2012; HORIE *et al.*, 2007). Não foram encontrados na literatura nenhum estudo com uma validação análoga a do presente trabalho. Isso, provavelmente, se deve ao fato da comunidade científica ainda não ter estabelecido a necessidade de monitorar as cucurbitacinas.

7 Conclusões

Partindo do método QuEChERS foi desenvolvida uma adaptação do método para análise qualitativa e quantitativa de Cuc B em sementes de abóboras.

Foi avaliada a qualidade do processo que envolve a obtenção das farinhas sob o ponto de vista da microbiota. Todas as farinhas obtidas das abóboras adquiridas no

comércio varejista apresentaram odor característico, ficaram homogêneas e secas. Essas abóboras se encontravam dentro dos limites microbianos aceitáveis.

O método proposto neste estudo para análise de Cuc B por CLAE-UV/DAD demonstrou ser rápido, de fácil execução, exato e preciso. Este método quando aplicado para as farinhas de sementes de abóbora permitiu a obtenção de resultados com boa reprodutibilidade, repetibilidade e limites de detecção e quantificação adequados às normas como INMETRO (2011) e SANTE (2015).

Nesta metodologia foram utilizadas menores quantidades de amostras e por consequência, de sais, sorventes e solventes, o que resultou em análises com menores custos em relação aos métodos convencionais.

O método desenvolvido possui maior sensibilidade analítica para a detecção de cucurbitacina B em amostras de farinhas de sementes. Não foi possível obter valores de recuperação adequados para as polpas e cascas. Portanto não é preconizado o uso do método proposto para a análise nesses tipos de matrizes. Esse método permite avaliar Cuc B em faixas de concentração mais baixas devido a uma faixa de trabalho composta de concentrações bem menores se comparado aos métodos de análise de cucurbitacinas descritos na literatura e está de acordo com as normas da INMETRO (2011) e da SANTE (2015).

As sementes de abóboras cedidas pela Embrapa, unidade Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, demonstraram possuir maiores concentrações de cucurbitacina B em relação às sementes de *C. moschata* adquiridas no comércio varejista. Isso comprovou a eficiência do aprimoramento genético e fenotípico realizado nessas sementes da Embrapa. O valor médio de Cuc B, em µg/g destas sementes, foi de 5,652 para as pastas e de 2,962 para as moídas, enquanto que o valor das sementes de *C. moschata* foi de 0,752.

O estudo desenvolvido poderá auxiliar trabalhos de monitoramento de cucurbitacina B em alimentos geneticamente modificados.

Anexo 1

Valores críticos para o teste de *Cochran* no nível de significância de 5%. N=n° de repetições; k=n° de níveis. Fonte: UFPB website.

k \ n	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

8 Referências Bibliográficas

ABDEL-RAHMAN, M., Effect of Pumpkin Seed (*Cucurbita pepo* L.) Diets on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH): Chemical and Morphometric Evaluation in Rats. *World Journal of Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 33-40, 2006.

ALGHASHAM, A. A. Cucurbitacins – A Promising Target for Cancer Therapy. *International Journal of Health Sciences*, Qassim University, v. 7, n. 1, 2013.

AREL-DUBEAU, A. M.; LONGPRÉ, F.; BOURNIVAL, J.; TREMBLAY, C.; DEMERS-LAMARCHE, J.; HASKOVA, P.; ATTARD, E.; GERMAIN, M.; MARTINOLI, M. G. Cucurbitacin E Has Neuroprotective Properties and Autophagic Modulating Activities on Dopaminergic Neurons, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, volume 2014; artigo ID 425496, 15 páginas.

AYYAD, S. N.; ABDEL-LATEFF, A.; ALARIF, W. M.; PATACCHIOLI, F. R.; BADRIA, F. A.; EZMIRLY, S. T. In vitro and in vivo study of cucurbitacins-type triterpeneglucoside from *Citrullus colocynthis* growing in Saudi Arabia against hepatocellular carcinoma. *Environmental toxicology and pharmacology*, n. 33, p. 245-251, 2012.

BRUNETON, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 2. ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, p. 606-607, 1993.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G. ; PRESTES, O. D. ; ADAIME, M. B. ; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. *Scientia Chromatographica*, Santa Maria, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CAILI, F.; HUAN, S.; QUANHONG, L., A Review on Pharmacological Activities and Utilization Technologies of Pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, n. 61, p. 73-80, 2006.

CAO, X.; QIAO, J.; WANG, L.; YE, X.; ZHENG, L.; JIANG, N.; MO, W. Screening of glycoside isomers in *P. scrophulariiflora* using ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction and ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, n. 26, p. 740-748, 2012.

CARMO, G. A.; OLIVEIRA, F. R. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, F. A.; CAMPOS, M. S.; FREITAS, D. C. Teores foliares, acúmulo e partição de macronutrientes na cultura da abóbora irrigada com água salina. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n. 5, p. 512-518, 2011.

CHEN, J. C.; CHIU, M. H.; NIE, R. L.; CORDELL, G.; QIU, S. X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Natural Product Reports*, n. 22, p. 386-399, 2005.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1, p. 6-10, 1984.

DELAZAR, A.; GIBBONS, S.; KOSARI, A. R.; NAZEMIYEH, H.; MODARRESI, M.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Flavone C-Glycosides and Cucurbitacin Glycosides from *Citrullus Colocynthis*. *DARU*, v. 14, n. 3, p. 109-115, 2006.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography*, n. 935, p. 105-123, 2001.

DUANGMANO, S.; SAE-LIM, P.; SUKSAMRARN, A.; DOMANN, F. E.; PATMASIRIWAT, P. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 185, 2012.

DUKE, J. A. The green pharmacy herbal handbook: your comprehensive reference to the best herbs for healing. United States: RODALE, 2000.

EL-ADAWY, T., TAHA, K.M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin and paprika seed oils and flours. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v. 49, n. 3, p. 1253-1259, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Agricultural production, primary crops*. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 15 jan 2017.

FERREIRA, M. A. J.; MELO, A. M. T.; CARMO, C. A. S.; SILVA, D. J. H.; LOPES, J. F.; QUEIROZ, M. A.; MOURA, M. C. C. L.; DIAS, R. C. S.; BARBIERI, R. L.; BARROZO, L. V.; GONÇALVES, E. M.; NEGRINI, A. C. A. Mapeamento da distribuição geográfica e conservação dos parentes silvestres e variedades crioulas de *Cucurbita*. Parentes Silvestres das espécies de plantas cultivadas. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2006, Brasília. 44p.

FRANCO, B. D. G. M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, p. 27 a 31, 2008.

GONZÁLEZ, M. P. B.; GARZA, R. G. R.; GUTIÉRREZ, Y. Q., Inibição del crecimiento de *Giardia lamblia* por acción del extracto acuoso y metanólico de semillas de *Cucurbita pepo*. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, v. 1, n. 1, p. 117-133, 2010.

GRAZIOSE, R.; GRACE, M. H.; RATHINASABAPATHY, T.; ROJAS-SILVA, P.; DEKOCK, C.; POULEV, A.; LILA, M. A.; SMITH, P.; RASKIN, I. Antiplasmodial activity of cucurbitacin glycosides from *Datisca glomerata* (C. Presl) Baill. *Phytochemistry*, n. 87, p.78–85, 2013.

HORIE, H.; ITO, H.; IPPOUSHI, K.; AZUMA, K.; SAKATA, Y., IGARASHI, I. Cucurbitacin C – Bitter Principle in Cucumber Plants. *JARQ*, v. 41, n. 1, p. 65-68, 2007.

HU, R.; PENG, Y.; CHEN, B.; CHEN, Y.; HOU, X. Study on Tian Gua Di (*Cucumis melo* L.), an antihepatitis Chinese medicine. Preparation and assay of Gua Di Su and cucurbitacins B and E. *Zhongcaoyao*, n. 13, p. 445-447, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção Agrícola Municipal*. 2012. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 15 jan. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Pesquisa de orçamento familiares: 2008-2009; 2010*, Rio de Janeiro, 282 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Agropecuário, 2006. Abóboras (Morangas e Jerimum). Quantidade produzida, área e número de informantes, Brasil e Unidades da Federação. Rio de Janeiro. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 16 de janeiro de 2017.

INMETRO. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008. Revisão 04 – Jul/2011.

JANG, B. C.; SIM, H. S.; JEONG, B. Y.; PARK, H. M.; OH, M. J. Isolation of cucurbitacin E from pumpkin seed and analysis of its anti-cancer and anti-inflammatory activities. *The FASEB Journal*, n. 22, p.889-896, 2008.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Anticancer and anti-inflammatory activities of Cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*, n. 189, p. 11-16, 2003.

KAUSHIK, U.; AERI, V.; MIR, S. R. Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacognosy Reviews*, v. 9, n. 17, p. 12-18, 2015.

KAYA, G. I.; MELZIG, M. F. Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homoeopathic mother tincture of *Gratiola officinalis* L. by HPLC. *Pharmazie*, n. 63, p. 851-853, 2008.

KIM, S. R.; SEO H. S.; CHOI, H. S.; CHO, S. G.; KIM, Y. K.; HONG, E. H.; SHIN, Y. C.; KO, S. G. *Trichosanthes kirilowii* Ethanol Extract and Cucurbitacin D Inhibit Cell Growth and Induce Apoptosis through Inhibition of STAT3 Activity in Breast Cancer

Cells, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, volume 2013; artigo ID 975350, 9 páginas.

KREPSKY, P. B.; CERVELIN, M. O.; PORATH, D.; PETERS, R. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; FARIAS, M. R. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 3, p. 715-719, 2009.

LANG, K. L.; SILVA, I. T.; ZIMMERMANN, L. A.; MACHADO, V. R.; TEIXEIRA, M. R.; LAPUH, M. I.; GALETTI, M. A.; PALERMO, J. A.; CABRERA, G. M.; BERNARDES, L. S. C.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; CARO, M. S. B.; DURÁN, F. J. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, n. 20, n. 3016-3030, 2012.

LEHOTAY, S. J.; ANASTASSIADES, M.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

LEHOTAY, S. J.; ANASTASSIADES, M.; MAJORS, R. E. QuEChERS, a Sample Preparation Technique that Is "Catching On": An Up-to-Date Interview with the Inventors. *ICGC North America*, v. 28 n. 7, p. 504-516, 2010.

MACEDO, L. P. M.; GUEDES, J. V. C.; GARCIA, J. F. Cucurbitacinas como Fator de Resistência a Insetos-Praga. *Caatinga* (Mossoró, Brasil), v. 20, n. 2, p. 127-132, 2007.

MANSOUR, E.H.; DWORSCHAK, E.; POLLHAMER, Z.; GERGELY, A.; HOVARI, J. Pumpkin and canola seed proteins and bread quality. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 4, n. 1-2, p. 59-70, 1999.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, n. 161, p. 99-105, 2009.

METCALF, R. L.; METCALF, E. R. Plant kairomones in insect ecology and control. New York: Chapman & Hall. 1992. 168 p.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their Pharmacological Effects. *Phytotherapy Research*, v. 9, p. 159-168, 1995.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Cucurbita maxima* e *Cucurbita moschata* Disponível em <http://www.missouribotanicalgarden.org> Acesso em 11 de dezembro de 2016.

MURKOVIC, M.; PIIRONEN, V.; LAMPI, A. M.; KRAUSHOFER, T.; SONTAG, G. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chemistry*, n. 84, p. 359-365, 2004.

NASCIMENTO, W. M.; PESSOA, H. B. S. V.; SILVA, P. P. Produção de Sementes Híbridas de Abóbora do Tipo Tetsukabuto. XI Curso sobre Tecnologia de Produção de Sementes de Hortaliças Porto Alegre/RS – 16 a 18 de novembro de 2011.

NAVES, L. P. ; CORRÊA, A. D. ; ABREU, C. M. P. ; SANTOS, C. D. Nutrientes e propriedades funcionais em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2010.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo Fitoquímico de *Senna alata* por Duas Metodologias. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

SANTE/11945. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Safety of the Food Chain – Pesticides and biocides. European Commission – Directorate-General for Health and Food Safety. 2015.

SCHABORT, J. C.; POTGIETER, D. J. J.; DE VILLIERS, V. Cucurbitacin B Δ 23-Reductase from *Cucurbita Maxima*: Assay Methods, Isolation and Purification. *Biochimica Et Biophysica Acta*, n. 151, p. 33-46, 1968.

SEGER, C.; STURM, S.; HASLINGER, E.; STUPPNER, H. A New Cucurbitacin D Related 16,23-Epoxy Derivative and Its Isomerization Products. *Organic Letters*, v. 6, n. 4, p. 633-636, 2004.

SIGMA-ALDRICH, a part of Merck. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=cucurbitacin+B&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>> Acesso em 13 de novembro de 2016.

SILVA, L. M. M.; SOUSA, F. C.; FEITOSA, M. K. S. B.; CRUZ, C. S. A.; SOUSA, E. P. Qualidade Físico-Química de Farinha da Semente de Abóbora Desidratada em Estufa a 40°C. *Revista Verde (Mossoró-RN-Brasil)*, v. 6, n. 5, p. 154-159, 2011.

SILVA, I. T. ; CARVALHO, A. ; LANG, K. L. ; DUDEK, S. E. ; MASEMANN, D. ; DÚRAN, F. J. ; CARO, M. S. B. ; RAPP, U. R. ; WIXLER, V. ; SCHENKEL, E. P. ; SIMÕES, C. M. O. ; LUDWIG, S. In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of a Novel Semisynthetic Derivative of Cucurbitacin B. *PLOS ONE* 10 (2), p. 1-19, 2015.

SOUSA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F. Enciclopédia Agrícola Brasileira, v. 1. Editora da Universidade de São Paulo, 1995.

STEVENSON, D.G.; ELLER, F. J.; WANG, L.; JANE, J. L.; WANG, T.; INGLETT, G. E. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 4005-4013, 2007.

TANNIN-SPITZ, T.; BERGMAN, M.; GROSSMAN, S. Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 364, p.181–186, 2007.

TEPPNER, H. Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*). *Phyton*, n. 44, p. 245-308, 2004.

TOKER, G.; MEMISOGLU, M.; TOKER, M. C. ; YESILADA, E. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. *Fitoterapia*, n. 74, p. 618-623, 2003.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 944-948, 2004.

VERONEZI, C. M.; JORGE, N. Carotenóides em Abóboras, B.CEPPA, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 9-20, 2011.

YADAV, M.; JAIN, S.; TOMAR, R.; PRASAD, G. B. K. S.; YADAV, H. Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutrition Research Reviews*, n. 23, p. 184–190, 2010.

YOUNG KIM, M. ; KIM, E. J. ; KIM, Y. N. ; CHOI, C. ; LEE, B. H. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutrition Research and Practice*, v. 6, n.1, p. 21-27, 2012.

YOUNIS, Y. M. H.; GHIRMAY, S.; AL-SHIHRY, S. S. African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*, n. 54, p. 71-75, 2000.