

Cucurbita moschata (abóbora):
Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies de
Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis*

LORENA DE LIMA GLÓRIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2013

Cucurbita moschata (abóbora):
Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies de
Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis*

LORENA DE LIMA GLÓRIA

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

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira
Co-Orientador: Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 065/2013

Glória, Lorena de Lima

Cucurbita moschata (abóbora) : caracterização química e atividade antibacteriana para espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* / Lorena de Lima Glória. – 2013.

97 f. : il.

Orientador: Daniela Barros de Oliveira.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 88 – 97.

1. *Cucurbita moschata* 2. Atividade antioxidante 3. Atividade antibacteriana 4. Alimento funcional I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 664.80462

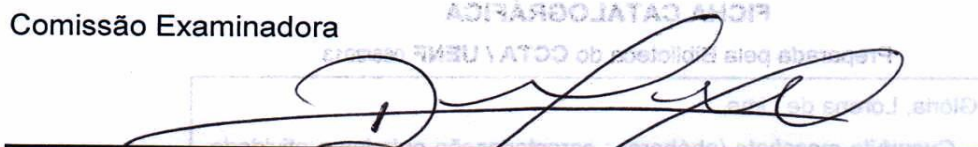
Cucurbita moschata (abóbora):
Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies
de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

LORENA DE LIMA GLÓRIA


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

Aprovada em 18 de abril de 2013

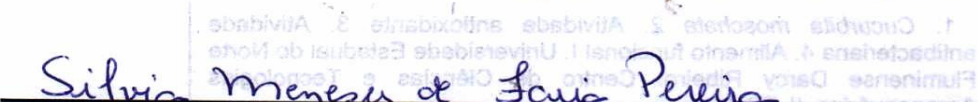
Comissão Examinadora



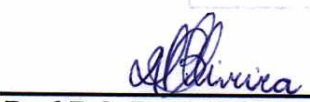
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (D.Sc., Química de Produtos
Naturais) UFRJ



Prof. Dr. Olney Vieira da Motta (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia)
UENF



Prof. Drª Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Engenharia e Ciência dos
Materiais) UENF



Prof. Drª Daniela Barros de Oliveira (D.S., Química de Produtos Naturais)
UENF (Orientadora)

*Aos meus pais Tadeu e Penha,
meus irmãos Pablo e Lara e
meu noivo Tiago.*

*" Fé e Esperança...
Onde encontro forças para olhar
Para as dificuldades e saber que Deus
Vê-me muito além do que eu posso imaginar
Nele respiro fundo e...
Começo tudo de novo
Só por Ele, Nele e com Ele."*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter sempre iluminado e guiado meus caminhos, sendo meu abrigo nas tempestades e criando saídas, onde parecia não haver escapatórias. Sem Deus nada seria possível e esta conquista nunca teria sido alcançada.

À UENF que me permitiu desenvolver aqui esse trabalho.

À Capes pelo suporte financeiro.

Agradeço aos Professores Douglas Siqueira de Almeida Chaves, Olney Vieira da Motta e Silvia Menezes de Faria Pereira por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Agradeço à Professora Daniela Barros de Oliveira que desde o início esteve sempre de portas abertas para mim, confiando no meu trabalho e me dando esperanças para seguir em frente. Agradeço por toda sua confiança, dedicação, companheirismo, ensinamento, paciência e amizade. Com certeza você mudou pra sempre minha vida acadêmica e pessoal, muito obrigada por tudo.

Agradeço ao professor Douglas Siqueira de Almeida Chaves por ter aceitado participar deste trabalho, mostrando-se sempre tão solícito todas as vezes que lhe procurei.

Agradeço ao professor Olney Vieira da Motta que me abriu as portas de seu laboratório possibilitando a realização da parte biológica desse trabalho. Muito obrigada pela sua confiança, suas ideias, sua disponibilidade e competência. Seus ensinamentos foram fundamentais para o desfecho dessa dissertação.

Aos meus pais Tadeu e Penha que sempre me incentivaram a realizar esse sonho e me fortaleceram nos momentos de aflição. Vocês me fizeram acreditar que sou capaz e se hoje estou me tornando Mestra, é por vocês!

Aos meus irmãos Pablo e Lara que mesmo distantes nunca se fizeram ausentes. Muito obrigada pelo amor de vocês dois, por me proporcionarem prazerosos momentos de descontração e por acreditarem em mim.

Ao meu noivo Tiago, que esteve comigo em todos os momentos dessa dissertação, sendo minha fortaleza nos momentos mais difíceis e meu maior incentivador. Agradeço principalmente por sua paciência e amor que me davam forças para não desistir de lutar. Parte desse trabalho é seu também, amo você!

Às minhas amigas de laboratório Natalia e Larissa que são muito mais que parceiras de trabalho, tornando-se confidentes e cúmplices, quase irmãs. Vocês tornaram essa caminhada bem mais branda. Obrigada por toda ajuda, paciência, risadas e amizade. Vocês são mais que especiais pra mim!

Agradeço também aos amigos Rodrigo, Lucy, Clara, Isabela, Shalline, Mariana, Simone, João, Raphael e Geraldo pela ajuda nos experimentos, companheirismo e momentos de distração. Agradeço a Vanessa, principalmente nos intermináveis estudos de estatística e bioquímica. Não teria conseguido sem vocês.

À minha prima Kamilla que é a irmã que eu pude escolher, obrigada por cada momento que dividimos.

À Silvinha, que fez a distância do “colinho de mãe” ser diminuída com todo seu carinho, conselhos, amizade, companheirismo, orações, incentivo, preocupação e dedicação. Você é uma pessoa iluminada. Obrigada por tudo que você fez e faz por mim.

À professora Solange Silva Samarão que a vida me proporcionou a doce surpresa de fazer com que nossos trabalhos se cruzassem novamente. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, dedicação, conversas e apoio.

Enfim, a todos que me ajudaram, cada um do seu modo, de maneira direta ou indireta, a conquistar esta vitória. Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIações	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 – Objetivo geral	4
2.2 – Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 – Composição química	5
3.3.1 – Lipídios	6
3.3.2 – Proteínas	7
3.3.3 – Carboidratos	8
3.2 – Alimentos funcionais	10
3.3 – Radicais livres X antioxidantes	11
3.4 – Atividade antibacteriana a partir de extratos vegetais	13
3.4.1 – O uso de antimicrobianos em alimentos	14
3.4.2 – Gênero <i>Staphylococcus</i>	16

3.4.3 – Cucurbitaceas no combate à <i>Staphylococcus</i>	18
3.5 – Material vegetal	19
3.5.1 – Descrição botânica	20
3.5.2 – Constituintes químicos de <i>Cucurbita moschata</i>	22
3.5.3 – Propriedades medicinais X substâncias isolada	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 – Coleta de material vegetal	25
4.2 – Análises de caracterização química	26
4.2.1 – Umidade	26
4.2.2 – Lipídios totais	26
4.2.3 – Nitrogênio total (proteínas)	26
4.2.4 – Açúcares redutores e totais (carboidratos)	27
4.3 – Preparo do extrato metanólico	27
4.4 – Fracionamento do extrato metanólico	28
4.5 – Atividade antioxidante	32
4.6 – Ensaio biológico do extrato metanólico e frações	34
4.6.1 – Micro-organismos	34
4.6.1.1 – Preparo dos inóculos	34
4.6.2 – Avaliação da atividade antimicrobiana	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 – Análises físico-químicas	37
5.2 – Análises cromatográficas	39
5.2.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	40
5.2.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
5.2.2.1 – Cromatograma do extrato bruto metanólico (ECM)	42
5.2.2.2 – Cromatograma da fração FA	43
5.2.2.3 – Cromatograma da fração G2	44
5.2.2.4 – Cromatograma da fração G2A	46
5.2.2.5 – Cromatograma da fração A2	47
5.2.2.6 – Cromatograma da fração B1	48
5.3 – Atividade antioxidante (método do DPPH)	50
5.4 – Atividade antibacteriana	57
5.4.1 – <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	58
5.4.2 – <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	63

5.4.3 – <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	69
5.4.4 – <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	74
5.4.5 – Avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente a diferentes cepas de <i>Staphylococcus</i>	80
5.5 – Relação entre a parte química e a parte biológica	81
6. RESUMO E CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abóbora (<i>Cucurbita moschata</i>)	21
Figura 2 - Estrutura química de alguns constituintes caracterizados de <i>Cucurbita moschata</i>	23
Figura 3 - Esquema da obtenção do extrato metanólico da polpa de abóbora	28
Figura 4 - Esquema de fracionamento e purificação do extrato metanólico da polpa de abóbora	31
Figura 5 - Esquema da atividade antimicrobiana do extrato metanólico e das frações da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> pelo método da diluição em meio líquido	36
Figura 6: Cromatograma em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e das frações obtidas a partir da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora), mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (3:1:1) e revelado com sulfato cérico	40
Figura 7: Cromatograma em Camada Delgada (CCD) da fração B1 da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora). Fase móvel: butanol: ácido acético: água (3:1:1) e revelado com sulfato cérico	41
Figura 8: Cromatograma do perfil químico do Extrato Metanólico Bruto (ECM) oriundo de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm, e o espectro de UV do pico de retenção de	

3,499 minutos	42
Figura 9: Cromatograma do perfil químico da fração FA (fração 100% aquosa) oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,488 minutos	44
Figura 10: Cromatograma do perfil químico da fração G2 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,376 minutos	45
Figura 11: Cromatograma do perfil químico da fração G2A oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,302 minutos	46
Figura 12: Cromatograma do perfil químico da fração A2 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,300 minutos	48
Figura 13: Cromatograma do perfil químico da fração B1 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,412 minutos	49
Figura 14: Estrutura química da quercetina (A), da apigenina (B) e da rutina (C)	51
Figura 15: Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado	51
Figura 16: Reação entre o DPPH e um flavonóide	52
Figura 17: Estrutura química do ácido ascórbico	53
Figura 18: Oxidação do ácido ascórbico em deidroascórbico	53
Figura 19: Estrutura química do antioxidante comercial BHT	54
Figura 20: Reação química entre o radical DPPH e o BHT	54
Figura 21 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	58
Figura 22 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	59

Figura 23 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	60
Figura 24 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	61
Figura 25 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	62
Figura 26 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	64
Figura 27 - Atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	64
Figura 28 - Atividade antibacteriana da fração FA de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	65
Figura 29 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	65
Figura 30 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	66
Figura 31 - Atividade antibacteriana da fração G2A de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	67
Figura 32 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	67

Figura 33 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	68
Figura 34 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	70
Figura 35 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	71
Figura 36 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	71
Figura 37 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	72
Figura 38 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	73
Figura 39 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	75
Figura 40 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	76
Figura 41 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2	

de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	76
Figura 42 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	77
Figura 43 - Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	78
Figura 44: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 3,302 minutos, correspondente a fração G2A	83
Figura 45: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 9,434 minutos, correspondente a fração G2A	83
Figura 46: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 16,903 minutos, correspondente a fração G2A	84
Figura 47: Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Staphylococcus</i> mais importantes na clínica médica	17
Tabela 2 - Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta aplicado nas frações	29
Tabela 3 - Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE	32
Tabela 4 - Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos	34
Tabela 5 - Concentração das amostras usadas no ensaio biológico	35
Tabela 6 - Teores de umidade, lipídio, proteína e carboidrato da polpa da abóbora em termos percentuais (g/100g de amostra)	37
Tabela 7: Área do pico majoritário no tempo de 3,499 minutos do cromatograma do perfil químico do Extrato Metanólico Bruto de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	43
Tabela 8: Área do pico majoritário no tempo de 3,488 minutos do cromatograma do perfil químico da fração FA oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	44
Tabela 9: Área dos picos listados no cromatograma do perfil químico da fração G2 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	45
Tabela 10: Área dos picos listados do cromatograma do perfil químico da fração G2A oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	47

Tabela 11: Área do pico majoritário no tempo de 3,300 minutos do cromatograma do perfil químico da fração A2 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	48
Tabela 12: Área do pico majoritário no tempo de 3,412 minutos do cromatograma do perfil químico da fração B1 oriunda de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm	49
Tabela 13 - Atividade antioxidante pelo método do DPPH do extrato metanólico, frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina, além do ácido ascórbico e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT)	54
Tabela 14 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	62
Tabela 15 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	69
Tabela 16 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	73
Tabela 17 - Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de <i>Cucurbita moschata</i> (abóbora) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa clínica humana	78
Tabela 18 - Avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente à diferentes cepas de <i>Staphylococcus</i>	80

LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Açúcares Redutores
ART	Açúcares Redutores Totais
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butil-Hidroxi-Tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetil sulfoxido Deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EEC	Estação Experimental de Campos
EM	Espectrometria de Massas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IV	Infravermelho
McF	McFarland
MH	Müller Highton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
NT	Nitrogênio Total

PABA	Ácido <i>para</i> -aminobanzóico
R _f	Fator de Referência
RL	Radicais Livres
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-2	Fase inversa com dois átomos de carbono
Tr	Tempo de Retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

RESUMO

GLÓRIA, L.L. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril de 2013. *Cucurbita moschata* (abóbora): Caracterização Química e Atividade Antibacteriana para espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira; Co-Orientador: Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) em colaboração com o Laboratório de Sanidade Animal (LSA), ambos pertencentes ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ. O objetivo do mesmo foi avaliar o perfil químico da polpa e frações de abóboras (*Cucurbita moschata*), sua composição química, a atividade antioxidante e a capacidade de inibir o crescimento de cepas da bactéria *Staphylococcus*, o que justificaria o uso dessa Cucurbitaceae como um possível alimento funcional, e seu uso como antibacteriano. Para a obtenção do extrato bruto, as polpas das abóboras foram maceradas, liofilizadas e submetidas à extração com metanol (10% p/v). Os fracionamentos cromatográficos foram realizados com o intuito de se obter uma substância mais purificada (B1). As polpas de abóboras tiveram seus teores de umidade, lipídios, proteínas e

carboidratos testados por metodologias preconizadas e os valores observados estavam de acordo com os da literatura. Em relação à atividade antioxidante verificou-se que ocorreu um aumento da capacidade de sequestro de radicais livres com a purificação e a fração G2A apresentou um poder antioxidante superior a 90% nas três concentrações analisadas. Na análise microbiológica, verificou-se que o crescimento de *Staphylococcus* foi inibido à medida que as frações foram purificadas e foi possível observar 100% de inibição do crescimento da cepa bacteriana para as frações G2 e G2A. Desta forma, este trabalho permitiu conhecer quimicamente as polpas de abóboras e verificar sua atividade antioxidante e antibacteriana, o que contribui para o seu possível uso como inibidor de crescimento de *Staphylococcus* e uma potente sequestradora de radicais livres.

ABSTRACT

GLÓRIA, L.L. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril de 2013. *Cucurbita moschata* (pumpkin): Chemical Characterization and Antibacterial Activity for species *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Advisor: Prof. Dr^a. Daniela Barros de Oliveira; Co-Advisor: Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves.

This work was performed at the Laboratory of Food Technology (LTA) in collaboration with the Laboratory for Animal Health (LSA), both belonging to the Centre of Agricultural Sciences and Technology (CCTA), the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) fields Goytacazes, RJ. The purpose of it was to evaluate the chemical profile of fractions of pumpkins and squash (*Cucurbita moschata*), its chemical composition, antioxidant activity and ability to inhibit the growth of strains of the bacterium *Staphylococcus*, which would justify the use of this as a possible food Cucurbitaceae functional, and its use as an antimicrobial. To obtain a crude extract, the pulps of pumpkins were macerated, lyophilized and subjected to extraction with methanol (10% w/v). The chromatographic fractionations were carried out in order to obtain a more purified substance (B1). Pulps pumpkins had their moisture, lipids, proteins and carbohydrates tested methodologies advocated by and observed values were consistent with the literature. In relation to the antioxidant activity was found that

there was an increased capacity for scavenging free radicals with the purification, the fraction G2A antioxidant showed a greater than 90% at the three concentrations tested. In microbiological analysis, it was found that the growth of *Staphylococcus aureus* was inhibited as fractions were purified and it was observed 100% inhibition of growth of the bacterial strain for the fractions and G2A G2. Thus, this study helped identify chemical pulps pumpkins and verify its antibacterial and antioxidant activity, which contributes to its possible use as an inhibitor of growth of *Staphylococcus* one potent free radical scavenging.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento do setor agrícola foi acompanhado pelo desenvolvimento de pesquisas na área de tecnologia alimentícia, a fim de atender às demandas da população que acredita que os alimentos contribuem diretamente para o seu bem estar. Esta tendência acarretou um crescente consumo de frutas e hortaliças em todo o mundo (Falguera et al., 2012; Chen, 2011; Silva et al., 2009). Nesse contexto, os alimentos funcionais representam uma área interessante para a indústria de ciência e tecnologia de alimentos de modo que, os mesmos sejam vistos não apenas como uma forma de fornecer os nutrientes necessários para o indivíduo, mas que eles possam atuar tanto no melhoramento das funções fisiológicas, bem como na redução dos riscos de doenças (Annunziata e Vecchio, 2011; Chen, 2011).

Várias patogenicidades como diabetes *mellitus*, inflamações, doenças cardíacas, aterosclerose, problemas pulmonares e processos de mutagênese e carcinogênese podem ser agravadas pela formação de radicais livres no organismo (Bernardes, et al., 2010; Mariod, et al., 2010; Awah et al., 2010; Halliwell, 2009; Wu e Ng, 2008). Sendo assim, é considerável a atenção voltada à descoberta de propriedades antioxidantes a partir de recursos naturais como plantas, animais e micro-organismos, por serem promissores agentes terapêuticos na prevenção da formação de radicais livres e seus efeitos deletérios (Liu et al., 2011; Ngo et al., 2010; Awah et al., 2010).

Diversos produtos naturais como frutas, verduras, legumes e hortaliças, não só têm importante papel na alimentação humana, como também apresentam em sua composição substâncias químicas que atuam no organismo humano e animal, reduzindo os riscos de certas doenças (Alves et al., 2010).

Os frutos de abóbora (*Cucurbita moschata*) são utilizados como importante fonte nutritiva à população por serem ricos em vitaminas e minerais, além de possuírem propriedades medicinais como ação antioxidante, antidiabética, anticancerígena, antiinflamatória, antibacteriana, entre outras (Jacob-Valenzuela et al., 2011; Yadav et al., 2010; Caili et al., 2006; Carvalho et al., 2009).

Algumas fontes vegetais têm sido usadas durante séculos como fitoterápicos para doenças humanas, já que as mesmas contêm componentes de valor terapêutico (Ravishankar et al., 2012). Existem inúmeras substâncias naturais isoladas a partir plantas que possuem atividades anti-fúngicas, antibacterianas e anti-protozoários, podendo ser utilizadas sistemicamente ou localmente (Al-Bakri e Afifi, 2007; Caili et al., 2006). Durante a segunda metade do século 20, a aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde, além do desenvolvimento de resistência microbiana aos antibióticos clássicos, fez com que muitos pesquisadores começassem a investigar a atividade antimicrobiana de várias plantas medicinais (Al-Bakri e Afifi, 2007). Antimicrobianos de origem vegetal apresentam enorme potencial terapêutico, sendo eficazes para o tratamento de doenças infecciosas, ao mesmo tempo que minimizam muitos dos efeitos colaterais que são frequentemente associados com agentes antimicrobianos sintéticos (Ravishankar et al., 2012; Caili et al., 2006; Al-Bakri e Afifi, 2007).

Entre os micro-organismos que podem ter seu crescimento inibido por extratos de plantas medicinais encontram-se os *Staphylococcus* que são espécies de bactérias que normalmente fazem parte da microbiota normal humana podendo ser encontrados na pele, boca, nariz, intestino e outros sítios anatômicos. Eles são considerados um dos micro-organismos mais comuns nas infecções em todo o mundo sendo que, algumas espécies de *Staphylococcus*, principalmente os *Staphylococcus aureus*, também são considerados contaminantes microbiológicos por estarem associados a quadros de toxinfecções alimentares (Polakowska et al., 2012; Carlos et al., 2010; Santana et al., 2010).

Relatos de atividade antimicrobiana para espécies da família Cucurbitaceae, utilizando extratos a partir da polpa, cascas ou sementes dos frutos, são descritos na literatura, merecendo destaque a *Cucurbita moschata* que já se mostrou eficaz na inibição de micro-organismos como: *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veroni*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, além de *Staphylococcus wernerii* e *Staphylococcus aureus* (Ravishankar et al., 2012; Abd El-Aziz Abd El-Kalek, 2011; Hammer et al., 1999).

Existem diversos trabalhos que avaliam a atividade antioxidante da *Cucurbita moschata* em nível de sementes, porém pesquisas relacionadas ao potencial de sua polpa ainda são escassas. Também não há registros de estudos que apontam a polpa dessa Cucurbitaceae como um agente antibacteriano. Dessa forma, o enfoque principal deste estudo é baseado na avaliação da composição química da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora), caracterização das substâncias químicas presentes nos seu extrato e frações, além de avaliar sua ação antioxidante e capacidade de inibir o crescimento bacteriano de *Staphylococcus*, podendo justificar sua utilização como agente antibacteriano e um possível alimento funcional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é caracterizar quimicamente a polpa de abóboras (*Cucurbita moschata*) coletadas na PESAGRO – RIO no município de Campos dos Goytacazes, bem como investigar sua atividade antioxidante e atividade biológica na inibição do crescimento de bactérias do gênero de *Staphylococcus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*) através de análises químicas;
- Avaliar o perfil químico do seu extrato e suas frações por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscopia de Ultravioleta (UV);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e das frações preparadas a partir da polpa da abóbora pelo método do DPPH;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos e frações em diferentes cepas de *Staphylococcus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Composição química

O conhecimento das informações nutricionais faz com que a população passe a escolher melhor os tipos de alimentos que irão utilizar no seu dia a dia. Estudos demonstram que as pessoas que seguem estas recomendações regularmente apresentam um maior consumo de frutas, verduras e vegetais, bem como uma menor ingestão de gorduras totais e ácidos graxos (Papadaki, et al., 2011).

A composição química centesimal de um alimento expressa o seu potencial em nutrientes, sendo esses dados importantes para a indústria de alimentos (Alves et al., 2010). A Ingestão Diária Recomendada (IDR) é a quantidade de vitaminas, minerais e proteínas que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais de uma pessoa. Para a população consumir equilibradamente os nutrientes de acordo com a IDR, são necessários dados sobre composições de alimentos. Essas composições são importantes para inúmeras atividades, como para avaliar o suprimento e o consumo alimentar de um país, verificar a adequação nutricional da dieta de indivíduos e de populações e seu estado nutricional, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, em planejamento agropecuário, na indústria de alimentos, além de outras (Gondim et al., 2005; Torres et al., 2000).

A obtenção de dados referentes à composição de alimentos no Brasil tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e

adequadas à realidade nacional (Gondim et al., 2005). A determinação da composição centesimal da abóbora contribui significativamente para a valorização dessa Cucurbitaceae em indústrias alimentícias (Rezig, et al., 2012).

3.1.1 Lipídios

O termo “lipídio” pode ser definido como uma classe de compostos orgânicos que são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (acetona, éter e clorofórmio). Além de serem compostos altamente energéticos, eles atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. Podem ser classificados em simples e compostos. Os lipídios simples são conhecidos como óleos e gorduras, que só diferem entre si na aparência física, uma vez que à temperatura ambiente, os óleos têm aspecto líquido e as gorduras aspecto pastoso ou sólido. Já os lipídios compostos abrangem os fosfolipídeos, ceras, entre outros, e os derivados, como os ácidos graxos e esteróis (Fahy et al., 2011; Manhães, 2007).

Esses compostos também podem ser classificados quanto ao comprimento da cadeia de carbono (ácidos graxos de cadeia curta, aqueles com até 4 carbonos; de cadeia média, contendo de 6 - 12 carbonos; de cadeia longa, com mais de 12 carbonos), quanto à saturação da cadeia, ou seja, quanto ao número de duplas ligações e quanto à posição da dupla ligação. As gorduras saturadas estão relacionadas ao aumento do nível de colesterol sanguíneo enquanto que as gorduras insaturadas estão envolvidas com a diminuição dos níveis de colesterol total no sangue, atuando principalmente na redução de colesterol ruim. A substituição da ingestão de gorduras saturadas, presentes em maior quantidade em alimentos de origem animal, pelas insaturadas está relacionada ao efeito protetor contra o surgimento de doenças coronarianas (Manhães, 2007; Pinheiro et al., 2005).

Os lipídios constituem um grupo de diversos compostos que possuem muitas funções biológicas importantes, tais como função estrutural em membranas celulares, servem como fontes de armazenamento de energia e participam de vias de sinalização (Fahy et al., 2011). Os teores de lipídios de fontes vegetais têm atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas

propriedades específicas que possibilitam que esses compostos orgânicos possam ter a função de agente emulsionante para uma ampla variedade de produtos que vão desde vacinas, alimentos, cosméticos e produtos de cuidados pessoais (Adams et al., 2012; Bhatla et al., 2010).

Existem diversos relatos na literatura que mencionam o teor de lipídios encontrados na polpa de abóboras (*Cucurbita moschata*). A Tabela de Composição de Alimentos da Endef/IBGE, 1999 estabeleceu um teor de 0,3% de lipídios em abóboras, enquanto que Nutrient Database for Standard Reference, 2001 determinou o valor de 0,1% de lipídios, já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2008 achou o valor de 0,2% de lipídios, e, por fim, a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) determinou que as polpas de abóboras apresentam somente traços de lipídios em sua composição.

3.1.2 Proteínas

As proteínas são componentes primordiais das células vivas e são resultantes da condensação de aminoácidos, com formação da ligação peptídica (Pinheiro et al., 2005). Os alimentos ricos em proteína são obtidos primariamente da carne ou produtos de origem animal, tais como leite e ovos (Ng et al., 2010). Essas substâncias dispõem de uma série de funções biológicas como: regeneração de tecidos; catalisadores nas reações químicas que se dão nos organismos vivos e que envolvem enzimas ou hormônios; são necessárias nas reações imunológicas e, juntamente com ácidos nucleicos, são indispensáveis nos fenômenos de crescimento e reprodução, entre outras (Ng et al., 2010; Manhães, 2007).

Na verdade, o valor nutricional das proteínas alimentares está relacionado ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, associado à sua digestibilidade. São comumente encontrados na natureza 20 aminoácidos que podem ser classificados como essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo não é capaz de sintetizar e por isso devem ser incluídos na dieta, são eles: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Em contrapartida, os aminoácidos não

essenciais são aqueles que o organismo consegue produzir e como exemplo tem-se: alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina (Hammond e Jez, 2011; Pinheiro, et al., 2005).

Os aminoácidos possuem na sua estrutura química um grupo carboxila e um grupo amina, ligados a um carbono α central, além de um átomo de hidrogênio e um grupo funcional (grupo R), que é o fornecedor da identidade dos aminoácidos. Exceto o grupo R, todos os outros componentes são idênticos em todos os aminoácidos. Ao se ligarem por ligações peptídicas formadas entre a carboxila OH do primeiro aminoácido e o nitrogênio do seguinte, formam uma longa cadeia de peptídeos, que são as proteínas (Hammond e Jez, 2011; Manhães, 2007).

Existem diversos relatos na literatura que mencionam o teor de proteínas encontradas na polpa de abóboras (*Cucurbita moschata*). A Tabela de Composição de Alimentos da Endef/IBGE, 1999 estabeleceu um teor de 1,2% de proteínas em abóboras, enquanto que Nutrient Database for Standard Reference, 2001 determinou o valor de 1,0% de proteínas. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2008 achou o valor de 1,27% de proteínas. Alves, et al., 2010 estabeleceram o valor de 1,3% de proteínas, e, por fim, a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) determinou que as polpas de abóboras apresentam somente 0,6% de proteínas em sua composição.

3.1.3 Carboidratos

Carboidratos abrangem um dos grandes grupos de biomoléculas na natureza, além de serem a mais abundante fonte de energia. O termo “carboidrato” surgiu por se acreditar que os átomos de carbono estavam de alguma maneira combinados com a água (hidratos de carbono) de acordo com a fórmula empírica dos açúcares mais simples: $C_n(H_2O)_n$ embora esta definição não seja adequada para os oligo- e polissacarídeos. Eles podem ser chamados, de uma maneira geral, de glicídios, amido ou açúcar (Ghazarian et al., 2011; Manhães, 2007, Pinheiro et al., 2005).

Esses compostos são formados por várias moléculas de monossacarídeos ligadas através de ligações hemiacetálicas ou ligações glicosídicas. Sendo assim, as moléculas de monossacarídeos podem formar uma variedade de outras macromoléculas como os di-, tri-, oligo- ou polissacarídeos. Os monossacarídeos correspondem ao tipo de carboidrato mais simples encontrado na natureza, sendo que os exemplos mais comuns são a glicose, a frutose e a galactose. Já os dissacarídeos são compostos formados por duas moléculas de monossacarídeos como a maltose (glicose-glicose), a sacarose (glicose-frutose) e a lactose (glicose-galactose). Os oligossacarídeos são os compostos que resultam de 2 a 10 monossacarídeos. E por fim, os polissacarídeos, que possuem mais de 10 monossacarídeos em sua estrutura. Como exemplos de polissacarídeos são conhecidos o amido e o glicogênio que estão presentes respectivamente nas plantas e animais com a função de armazenamento de energia, além da celulose e a pectina que são componentes da parede celular das plantas que lhes confere resistência (Ghazarian et al., 2011; Manhães, 2007).

Tanto a polpa quanto a casca da abóbora representam uma importante fonte de pectina vegetal (Caili et al., 2006). Polissacarídeos pécticos de frutas e legumes têm atraído grande atenção dos produtores e consumidores, devido às suas propriedades físicas, sua promoção da saúde e prevenção de doenças em potencial, além de serem empregados também em produtos cosméticos e farmacêuticos (Kastálová et al., 2013).

Existem diversos relatos na literatura que mencionam o teor de carboidratos encontrados na polpa de abóboras (*Cucurbita moschata*). A Tabela de Composição de Alimentos da Endef/IBGE, 1999 estabeleceu um teor de 9,8% de carboidratos em abóboras, enquanto que Nutrient Database for Standard Reference, 2001 determinou o valor de 6,5% de carboidratos. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2008 achou o valor de 4,66% de carboidratos; Alves, et al., 2010 estabeleceu o valor de 8,11% de carboidratos; e, por fim, a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) determinou que as polpas de abóboras apresentam somente 3,3% de carboidratos em sua composição.

3.2 Alimentos funcionais

O número crescente de alimentos funcionais no mercado reflete uma tendência de comercialização de alimentos inovadores (Carrilloa et al., 2013). Os alimentos funcionais têm aparecido desde meados de 1990, oferecendo não apenas os nutrientes necessários para uma boa dieta, mas também, benefícios de saúde específicos representando uma nova forma de caracterização dos alimentos em geral (Carrilloa et al., 2013; Lima Júnior et al., 2011). No entanto, este conceito não é oficial devido à falta de uma legislação específica que reconheça uma definição (Krystallisa et al., 2008).

Os alimentos funcionais diferem dos convencionais em vários aspectos. Estes últimos são, em geral, aqueles que contribuem para uma dieta saudável sem destacar o papel de uma única substância que torne esse produto mais atrativo ao consumidor. Já os alimentos funcionais apresentam substâncias específicas que estão diretamente relacionadas a algum benefício para a saúde, tais como: regular as funções fisiológicas do corpo humano, retardar o envelhecimento, apoiar o sistema imune contra doenças, entre outros (Khan et al., 2011; Urala e Lähteenmäki, 2004). É necessário que essas substâncias específicas sejam provenientes de fontes naturais e que demonstrem os seus efeitos em quantidades que normalmente podem ser esperadas para serem consumidas na dieta de um indivíduo (Carrilloa et al., 2013; Khan et al., 2011).

Um alimento funcional pode ser, também, aquele alimento que é desenvolvido pela adição de substâncias funcionais tecnologicamente desenvolvidas e que ofereçam potenciais benefícios para a dieta dos consumidores e novas oportunidades de negócios para os produtores (Annunziata e Vecchiob, 2013; Niva, 2007).

A capacidade de alguns alimentos funcionais possuírem propriedades medicinais, como por exemplo a redução do risco de doenças crônicas, tem sido associado, principalmente, à atividade desenvolvida pelos metabólitos secundários. Em geral, estes metabólitos podem apresentar um efeito fisiológico perceptível em um longo prazo, uma vez que serão ingeridos regularmente e em quantidades significativas, como parte da dieta diária (Vo e Kima, 2012; Espín et al., 2007). As vantagens desses produtos é que, além de efetivos, eles são mais seguros, mais viáveis economicamente e possuem menores efeitos colaterais em

comparação aos medicamentos rotineiramente prescritos para o tratamento de certos sintomas (Vo e Rima, 2012).

Os fatores que têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos funcionais são inúmeros, sendo um deles, a conscientização dos consumidores, que desejando melhorar sua qualidade de vida, optam por hábitos saudáveis. Entretanto, é necessária a comprovação desses benefícios através da pesquisa para esses alimentos serem considerados efetivos (Lima Júnior et al., 2011). Nos últimos anos, os pesquisadores têm concentrado esforços significativos na pesquisa de produtos naturais a partir de espécies vegetais, principalmente no Brasil, por apresentar uma grande e potencial biodiversidade. Uma das características que um alimento funcional pode apresentar é atividade antioxidante que é baseada na capacidade do alimento em sequestrar os radicais livres (Bernardes et al., 2010).

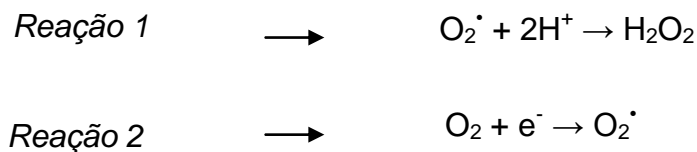
3.3 Radicais livres X antioxidantes

Os radicais livres (RL) podem ser caracterizados como moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons isolados ocupando um orbital atômico ou molecular (Halliwell, 2011; Bernardes et al., 2010). Essa configuração faz dos radicais livres, moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Bernardes et al., 2010).

O efeito cumulativo desses radicais provocam vários danos no organismo, como por exemplo, o declínio funcional de células e tecidos (Clancy e Birdsall, 2012). Os danos oxidativos são responsáveis por alterações tão alarmantes, que as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas nos tecidos, podendo chegar a provocar a morte celular. Esses danos têm sido relacionados ainda com várias patologias, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Os danos no DNA causados pelos radicais livres, também, desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (Bernardes, et al., 2010; Mariod, et al., 2010).

Os radicais livres e as EROs como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estão envolvidos em respostas fisiológicas e patológicas de

organismos vivos, além de serem muito reativos e potencialmente prejudiciais (Barna, et al., 2012; Ganinia, et al., 2012). O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado pela reação entre moléculas de substâncias que estão localizadas nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias com o oxigênio, em decorrência do metabolismo aeróbio. Se o O_2 é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reação 1); se receber apenas um elétron, o produto será o radical superóxido (O_2^{\bullet}) (Reação 2) (Clancy e Birdsall, 2012; Bernardes et al., 2012).



Fonte: Bernardes et al., 2010.

Para tanto, os antioxidantes são substâncias químicas que protegem um alvo biológico contra o dano oxidativo além de neutralizarem os efeitos nocivos dos radicais livres e EROs (Halliwell, 2011; Ali et al., 2008). Quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos, os antioxidantes são capazes de proteger o organismo humano contra inúmeras doenças (Bernardes et al., 2010).

É considerável a atenção voltada aos estudos da propriedade antioxidante a partir de recursos naturais como plantas, animais, micro-organismos e alimentos a fim de inibir a formação dos radicais livres e seus efeitos deletérios (Liu et al., 2011; Ngo et al., 2010). Numerosos extratos brutos derivados de plantas ganham, cada vez mais, interesse por parte dos pesquisadores, devido à sua ação em retardar a degradação oxidativa e assim melhorar a qualidade e valor nutritivo dos alimentos (Liu et al., 2011). A ingestão dietética de antioxidantes naturais presentes na maioria das fontes vegetais pode agir como potentes agentes preventivos de alterações relacionadas ao estresse oxidativo (Rios et al., 2009).

As reações de oxidação e de atividade microbiana são consideradas como as principais causas da deterioração dos alimentos. Além disso, a presença de bactérias patogênicas nos alimentos levou os investigadores a procurar novas alternativas para reduzir a incidência de doenças de origem alimentar, através do controle da qualidade microbiológica dos produtos alimentares (Ojeda-Sanaa et al., 2013; Rahman e Kang, 2009). Compostos bioativos, comumente encontrados

em fontes vegetais, têm sido estudados por apresentarem possíveis efeitos benéficos como atividade antioxidante, anticancerígena, anti-hipertensiva, antimutagênica e antibacteriana (Oloyede et al., 2012; Caili et al., 2006; Vaquero et al., 2010).

Trabalhos indicam uma relação entre a capacidade de sequestro de radicais livres e atividade antibacteriana de um mesmo extrato (Radovanovic et al., 2009; Ahmad et al., 2005; Copland et al., 2003). Em um determinado estudo, amostras ricas em polifenóis e antocianinas tiveram uma boa atividade antioxidante ao mesmo tempo em que conseguiram uma significativa inibição no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Radovanovic et al., 2009).

3.4 Atividade antibacteriana a partir de extratos vegetais

Há vários relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana para inúmeros extratos a partir de fontes vegetais em diferentes regiões do mundo (Ravishankar et al., 2012; Carlos et al., 2010; Park et al., 2009; Caili et al., 2006). Recentemente vários estudos foram realizados para identificar novos e potentes compostos antimicrobianos isolados de plantas, os chamados "Antibióticos naturais", porque estes possuem o potencial de ultrapassarem a resistência antimicrobiana (Ravishankar et al., 2012; Park et al., 2009).

A necessidade de se descobrir extratos naturais biologicamente ativos é devido ao surgimento de estirpes bacterianas que exibem efeitos colaterais e resistência clínica aos antibióticos convencionais (Ravishankar et al., 2012; Park et al., 2009).

Entre as bactérias que têm o seu crescimento testado com extratos de plantas encontram-se as do gênero *Staphylococcus*. As bactérias pertencentes a este gênero estão entre as mais frequentemente isoladas em clínica microbiológica e estão se tornando cada vez mais importante, especialmente por serem consideradas uma das principais causas de infecções hospitalares e toxinfecções em alimentos (Carlos et al., 2010; Vuong et al., 2000).

3.4.1 O uso de antimicrobianos em alimentos

Doenças transmitidas por alimentos são um desafio para a saúde pública mundial, principalmente em países subdesenvolvidos, onde este problema é geralmente mais acentuado. Uma ampla diversidade de bactérias patogênicas tem sido relacionadas às doenças de origem alimentar, sendo as principais: espécies do gênero *Salmonella* e *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Cruz-Galvez et al., 2013; Castillo et al., 2009; Moreno-Enriquez et al., 2007).

O uso de agentes antimicrobianos pode fornecer uma barreira de proteção adicional nos alimentos, no entanto, muitas vezes os consumidores não são favoráveis à inclusão de aditivos artificiais ou químicos. Além disso, estudos demonstraram que agentes antimicrobianos químicos, usados para inibir ou eliminar o desenvolvimento de micro-organismos, são limitados ou ineficazes. Assim, vários trabalhos relatam pesquisas, cujo foco principal versa sob os antimicrobianos de origem vegetal (Cruz-Galvez et al., 2013; Castro-Rosas e Escartín, 1999).

Substâncias antimicrobianas de origem natural são normalmente identificadas em diferentes partes dos vegetais, tais como folhas, caules, sementes, frutas e raízes. Mais de 1300 espécies oriundas de fontes vegetais são relatadas na literatura com a capacidade de apresentar atividade antimicrobiana a partir de compostos químicos presentes em sua composição, sendo que muitos deles já foram isolados e são usados em muitas áreas, incluindo na indústria de alimentos (Tajkarimi et al., 2010; Burt, 2004).

No estudo de Cruz-Galvez et al., 2013, foram avaliados trinta extratos de plantas usadas na medicina tradicional em Hidalgo (México). Esses extratos foram produzidos a partir de diferentes partes das plantas, sendo que a extração foi feita com os seguintes solventes: água, etanol, metanol, acetona, hexano e acetato de etila. A técnica da atividade antibacteriana empregada foi a técnica de difusão em meio Agar no qual, quatorze cepas bacterianas foram testadas, dentre elas estavam as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), que também foram utilizadas no presente trabalho.

A espécie *Momordica balsamina* L., que pertence à mesma família da abóbora (Cucurbitaceae) teve seis tipos de triterpenoides isolados das suas partes aéreas, e estes foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de alguns micro-organismos, entre eles uma bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), porém os resultados encontrados para essa bactéria não foram significativos (Ramalhete et al., 2011).

Mayachiew e Devahastin, 2008, avaliaram as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos etanólicos de *Phyllanthus emblica* Linn. e *Alpinia galang*. Para a determinação da atividade antimicrobiana, foi avaliada a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cepa esta que também foi utilizada na presente Dissertação, empregando-se dois métodos distintos: o método de difusão em disco e o método de diluição em Agar. Já a atividade antioxidante foi determinada pelo método do β -caroteno. Esses autores chegaram à conclusão de que os extratos avaliados, além de apresentarem uma boa atividade antioxidante, também se mostraram eficazes na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*.

A atividade antimicrobiana, bem como a atividade antioxidante dos óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) foi avaliada por Hussain et al., 2008. Neste trabalho foram avaliadas as condições sazonais, ou seja, se essas atividades sofriam interferências de acordo com a mudança das estações do ano (verão, outono, inverno e primavera). A avaliação antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em disco e determinação da concentração mínima inibitória, utilizando cepas dos seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida*, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae* e *Rhizopus solani*, sendo que, a cepa de *S. aureus* utilizada foi a ATCC 25923. A atividade antioxidante foi determinada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH e pelo método do β -caroteno. Os resultados dos ensaios antimicrobianos indicaram que todos os micro-organismos testados foram afetados e, tanto a atividade antioxidante quanto a antimicrobiana dos óleos essenciais de manjeriço variaram significativamente ($p < 0,05$), com a mudança das estações do ano.

Extratos etanólicos de própolis, usualmente comercializados no Brasil, foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, e quanto à sua capacidade antioxidante

pelo método do sequestro de radicais livres DPPH. Estas atividades foram correlacionadas com a presença de substâncias fenólicas em sua composição determinadas pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Foi concluído que a presença de substâncias fenólicas teve maior influência sob a atividade antioxidante dos extratos do que em seus perfis antimicrobianos (Silva et al., 2006).

3.4.2 Gênero *Staphylococcus*

Infecções causadas por *Staphylococcus* são de grande importância não só para medicina humana, mas também, para a medicina veterinária. Os *Staphylococcus* são um grupo de bactérias esféricas, com forma de cocos gram-positivos. Possuem aproximadamente de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro de comprimento, sendo ainda imóveis, não formadoras de esporos e geralmente não encapsuladas. É considerado um dos micro-organismos mais comuns nas infecções que produzem pus em todo o mundo (Polakowska et al., 2012; Santos et al., 2007).

Essas bactérias também são responsáveis por inúmeras contaminações alimentares. As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são consideradas um grande problema para a saúde pública mundial e esses contaminantes microbiológicos são os principais agentes associados aos quadros de toxinfecções alimentares (Santana, et al., 2010; Kérouanton, et al., 2007). Em alimentos, as espécies de maior importância são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. intermedius*, (Santana, et al., 2010; Cunha & Cunha, 2007), sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, devido à sua versatilidade nutricional e capacidade de crescer em diferentes condições ambientais, o que faz com que essa bactéria se desenvolva com facilidade em vários alimentos (Santana et al., 2010; Cunha e Cunha, 2007; Kérouanton, et al., 2007).

O gênero *Staphylococcus* é formado por 33 espécies, sendo que, 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente as bactérias pertencentes a esse gênero fazem parte da microbiota normal da pele humana e de outros sítios anatômicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) relacionou as espécies mais importantes na clínica para *Staphylococcus* (Tabela

1), sendo que as espécies de maior interesse são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, as quais são frequentemente relacionados a diversas infecções em seres humanos (Santos et al., 2007; Cassettari et al., 2005; Carlos et al., 2010).

Tabela 1: Espécies de *Staphylococcus* mais importantes na clínica médica.

As espécies mais importantes na clínica		
<i>S. lugundensis</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. schleiferi</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. capitis</i>
<i>S. sciuri</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. warnei</i>
<i>S. lentus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. saccharolyt.</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. caprae</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. gallinarium</i>	<i>S. hominis</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. aureus</i>

Fonte: Anvisa, 2012.

Staphylococcus aureus é uma bactéria considerada como um patógeno humano oportunista. É comum termos em nosso organismo, como na pele, boca, nariz, intestino, colônias dessa bactéria que não nos causam doenças somente enquanto permanecem restritas a esses locais. Quando ocorre uma lesão, as bactérias podem então entrar no corpo causando infecções brandas como terçol, furúnculo, foliculite, mastite, entre outras. Porém, se essas bactérias invadirem a circulação sanguínea, poderão atingir qualquer órgão, desencadeando infecções graves como a endocardite ou miocardite no coração, septicemia, pneumonia e meningite (Santos et al., 2007; Cavalcanti et al., 2005).

As bactérias *Staphylococcus epidermidis*, assim como as *S. aureus*, são consideradas um habitante normal da pele e das mucosas de membranas humanas e de animais, apesar de também causarem infecções, principalmente hospitalares (Carlos et al., 2010; Vuong et al., 2000). Esta espécie apresenta a característica de formar biofilmes, sendo responsável, principalmente, por infecções em pacientes que fazem uso de material invasivo de plástico (cateter,

próteses e sondas). Os biofilmes dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção (Vuong et al., 2000).

3.4.3 Cucurbitaceas no combate à *Staphylococcus*

São descritos na literatura o potencial antibacteriano de diversas espécies da família Cucurbitaceae, incluindo a *Cucurbita moschata* (Ravishankar et al., 2012; Abd El-Aziz Abd El-Kalek, 2011; Hammer et al., 1999). Esses estudos se diferenciam não só pelo tipo de micro-organismo que são testados, mas também pela parte da espécie que é utilizada no experimento variando de polpa, sementes, óleos de sementes, cascas, entre outros.

Um recente estudo com extrato etanólico de sementes de *Cucurbita maxima* avaliou a atividade antimicrobiana dessa Cucurbitaceae. Além de *Staphylococcus aureus*, outras bactérias foram avaliadas: *Staphylococcus wernerii*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o extrato da semente de *Cucurbita maxima* apresentou um ótimo espectro de inibição (Ravishankar et al., 2012).

Também foi estudado o óleo de sementes de *Cucurbita moschata* para a inibição de diferentes espécies de bactérias e dois tipos de fungos. As bactérias utilizadas foram: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* sendo que, todas foram inibidas na presença do extrato avaliado. Entretanto, os fungos estudados: *Rhodotorula rubra* e *Candida albicans* não permitiram que o extrato de óleo de sementes de abóbora fosse eficaz na inibição do seu crescimento (Abd El-Aziz Abd El-Kalek, 2011).

Ecballium elaterium (*E. elaterium*) é uma espécie de pepino pertencente à família Cucurbitaceae, que apresenta em sua composição a substância química cucurbitacina que é responsável pela maior parte dos efeitos farmacológicos e biológicos dessa planta. Devido ao seu sabor amargo forte, a cucurbitacina atua como agente purificador, estimulando a secreção gástrica, além de diminuir os danos da hepatite crônica e também é responsável pela atividade antimicrobiana e antifúngica (Adwan et al., 2011; Abou-Khalil, et al., 2009; Rios et al., 2004). O extrato etanólico de *E. Elaterium* foi avaliado quanto a sua atividade

microbiológica para diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Candida albicans*, verificando um significativo potencial de inibição (Adwan et al., 2011).

Um outro trabalho semelhante avaliou o extrato etanólico de *Momordica charantia* L., espécie pertencente à família Cucurbitaceae quanto à atividade antibiótica contra uma cepa clínica de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Ficou demonstrado que o *Momordica charantia* L., também conhecido como melão amargo, apresentou uma boa atividade antimicrobiana podendo ser utilizado como adjuvante na terapia antibiótica contra bactérias multiresistentes como o MRSA (Coutinho et al., 2010).

Em um trabalho realizado em 1999, diversas plantas e extratos foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana. Entre os extratos testados estava o extrato do óleo de semente de *Cucurbita pepo* e esse extrato foi eficiente na inibição dos seguintes micro-organismos: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veroni*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* além de *Staphylococcus aureus* (Hammer et al., 1999).

Não foi encontrado nenhum relato na literatura que mencione o uso de polpa de *Cucurbita moschata* como um inibidor de espécies de *Staphylococcus*, com isso, esse é o primeiro trabalho a abordar essa atividade antimicrobiana para a polpa dessa Cucurbitaceae.

3.5 Material vegetal

O uso de plantas para o tratamento de diversas patologias, prevenção e cura de problemas de saúde iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países (Nissen e Evans, 2012; Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2008). O conhecimento sobre essas plantas, desde que seja investigado seu estudo clínico e farmacológico com o objetivo de se determinar a sua eficácia, simboliza um excelente recurso terapêutico (Nissen e Evans, 2012). A cultura do uso de plantas e de outras fontes naturais com atividade biológica vem sendo valorizada devido à descoberta de novas drogas com menos encargos financeiro, à busca por hábitos

mais saudáveis de vida e pelo difícil tratamento de certas doenças (Cecílio et al., 2012; Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2008; Maciel et al., 2002).

Nas últimas décadas, a quantidade de informações sobre o uso de recursos vegetais de florestas tropicais aumentou significativamente (Santos et al., 2012). O Brasil possui grande biodiversidade e tem uma riqueza de conhecimento acumulado pela população local que tem acesso direto a natureza e a estes recursos que podem representar uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, o estudo de plantas como fontes de tratamento para certas enfermidades ainda deixa muito a desejar (Santos et al., 2012; Sousa et al., 2008; Montanari e Bolzani, 2001). Por conseguinte, torna-se necessário estimular a realização de pesquisas nessa área, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais como sociais.

A abóbora (*Cucurbita moschata*) é uma espécie brasileira e integra a diversidade biológica da região de Campos dos Goytacazes – RJ. Essa Cucurbitaceae apresenta propriedades medicinais como ação antioxidante, antidiabéticas, anticancerígena, antiinflamatórias, antibacteriana, entre outras (Jacob-Valenzuela et al., 2011; Yadav et al., 2010; Caili et al., 2006), sendo também uma importante fonte nutritiva para a população (Carvalho et al., 2009). Nesse sentido, o avanço no conhecimento químico a partir de sua polpa e do enfoque biológico sobre a utilização da mesma, principalmente seu efeito antibacteriano, provavelmente irá incentivar a comercialização da mesma.

3.5.1 Descrição botânica

A família Cucurbitacea é dividida em cinco subfamílias, são elas: Fevilleae, Melothrieae, Cucurbitaceae, Sicyoideae e Cyclanthereae. As Cucurbitaceaes compreendem cerca de 118 gêneros e mais de 800 espécies, constituindo uma das mais importantes famílias de plantas cultivadas pelo homem. Aproximadamente 26 espécies de Cucurbitaceae são cultivadas como hortaliças nas mais diversas regiões do mundo, sendo estas espécies predominantemente cultivadas para consumo e uso de seus frutos (Carvalho et al., 2009; Bisognin, 2002).

O gênero *Cucurbita* é nativo das Américas e é constituído por 15 espécies que são classificadas de acordo com a textura e forma de seus caules. Dentre as espécies mais cultivadas desta família podemos destacar a melancia (*Citrullus lanatus*), abóbora (*Cucurbita moschata*), abobrinha (*Cucurbita pepo*) e moranga (*Cucurbita maxima*), que representam importantes espécies economicamente cultivadas em todo o mundo além de ocupar uma parcela significativa do agronegócio brasileiro (Abd El-Aziz e Abd EL-Kalek, 2011; Grecco et al., 2011; Xanthopoulou et al., 2009).

A abóbora (*Cucurbita moschata*) (Figura 1) é a espécie mais tolerante a condições ambientais adversas entre os membros da sub-família Cucurbitaceae. Ela possui muitos componentes nutricionais em sua composição incluindo polissacarídeos, proteínas ativas, aminoácidos essenciais, carotenóides, e minerais. Essa Cucurbitaceae tem recebido uma considerável atenção nos últimos anos devido ao seu valor nutricional e de proteção a saúde por parte desses componentes (Abd El-Aziz e Abd El-Kalek, 2011; Caili et al., 2006).



Figura 1: Abóbora (*Cucurbita moschata*) – Fonte: Feltrin, 2012.

Cucurbita moschata cresce em climas tropicais ou sub-tropicais com umidade relativamente suficiente para o seu desenvolvimento. Seu habitat ideal são solos arenosos, bem drenados ou úmidos, apesar de resistirem a períodos de secas e geadas durante sua floração (Jacobo-Valenzuela et al., 2011). A abóbora é uma dicotiledônea com crescimento muito rápido, chegando a aumentar de 0,6 m por 5 m de diâmetro por ano. Na maturidade que dá origem a flores e frutos, que possuem uma quantidade significativa de sementes (Caili et al., 2006).

3.5.2 Constituintes químicos de *Cucurbita moschata*

A família Cucurbitaceae é quimicamente caracterizada por possuir diversas substâncias com potencialidades terapêuticas (Bisognin, 2002). Esta família apresenta alguns compostos químicos característicos como alcalóides (Yadav et al., 2010), terpenóides como as cucurbitacinas (Valente, 2004), saponinas, compostos fenólicos (Badifu, 2001), ácido ascórbico (Hancock et al., 2008), carotenos precursores da vitamina A (Bisognin, 2002), entre outros.

As abóboras (*Cucurbita moschata*) são frequentemente consideradas benéficas para a saúde devido ao fato de apresentarem componentes biologicamente ativos em sua composição como polissacarídeos, ácido *p*-aminobenzóico, esteróis, proteínas, peptídeos e óleos fixos (Adams et al., 2012; Yadav et al., 2010).

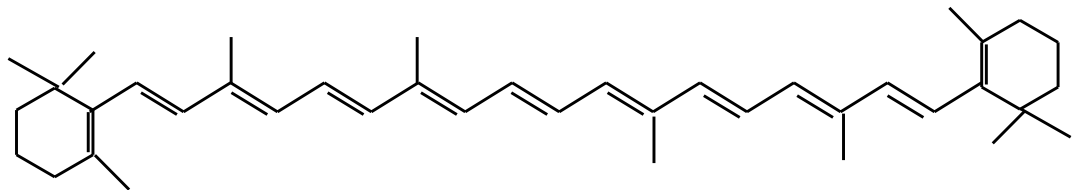
Existem relatos na literatura sobre essa Cucurbitaceae ser uma fonte importante de carotenóides (Jacobo-Valenzuela et al., 2011, Murkovic et al., 2002; González et al., 2001) especialmente β -caroteno e luteína, ambas as quais são importantes nutricionalmente (González et al., 2001). A evidência epidemiológica sugere que uma dieta rica em carotenóides é associada à melhoria da resposta imune e redução do risco de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, catarata, doenças relacionadas com a idade como degeneração macular (Jacobo-Valenzuela et al., 2011; Gonzalez et al., 2001). Outros carotenóides identificados para abóbora foram α -caroteno e violaxantina (Gonzalez et al., 2001).

Outro composto isolado de abóbora foi o ácido γ -aminobutírico (PABA) (Adams et al., 2012; Zhang, 2003; Murkovic et al., 2002). Este ácido é o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos mamíferos, desempenhando um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso (Zhang, 2003).

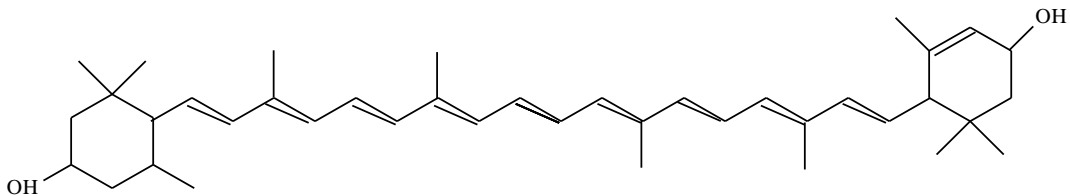
Estudos já caracterizaram também, a partir da polpa desses frutos, alguns polissacarídeos com atividade hipogliceminante. As investigações preliminares mostraram que uma dieta rica em abóbora possui a atividade farmacológica de reduzir a taxa de glicose no sangue (Adams et al., 2012; Koike et al., 2005). Xia e Wang (2006) isolaram o composto D-inositol a partir de um extrato de abóbora que age como mediador da ação da insulina auxiliando no tratamento de

diabéticos. As suas sementes são compostas de altas proporções de aminoácidos essenciais em sua composição (Glew et al., 2006).

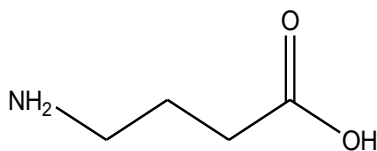
Essas substâncias bioativas caracterizadas possuem boa atividade biológica tais como: atividade antifúngica, antibiótica, antimicrobiana, entre outros (Yadav et al., 2010). As estruturas de algumas dessas substâncias são mostradas na Figura 2.



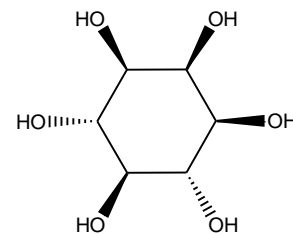
a) β -caroteno



b) Luteína



c) Ácido γ -aminobutírico



d) D-Inositol

Figura 2: Estrutura química de alguns constituintes caracterizados de *Cucurbita moschata*.

3.5.3 Propriedades medicinais X substância isolada

Apesar da abóbora ser bem conhecida para fins alimentícios, várias partes desta Cucurbitaceae também são utilizadas para fins terapêuticos. Uma diversidade significativa de substâncias já foram isolados de *Cucurbita moschata*,

porém, apenas algumas delas apresentam atividades biológicas e propriedades medicinais (Yadav et al., 2010).

Vários estudos têm sido conduzidos com o propósito de reconhecer o potencial antidiabético proveniente de extrato bruto de frutos de abóbora para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2 (Adams et al., 2012; Xia e Wang, 2006; Patiño et al., 2001).

Sementes de abóbora têm demonstrado um elevado teor de vitamina E que se caracteriza por ser um agente antioxidante inibindo assim a formação de radicais livres (Yadav et al., 2010). Além disso, dietas que se baseiam no óleo destas sementes também têm sido associadas ao menor risco de câncer de próstata, de estômago, de mama, pulmonar e retal (Jian et al., 2005; Huang et al., 2004).

Por possuir propriedades antioxidante, antimicrobiana, antiproliferativa e conservante, os ácidos fenólicos presentes em abóboras (Balasundram et al., 2006; Peschel et al., 2006; Robbins, 2003), possuem um importante papel na manutenção da saúde humana e prevenção da deterioração dos alimentos. E extratos etanólicos de *Cucurbita moschata* foram satisfatórios no tratamento de vermes e parasitas em países subdesenvolvidos (Caili et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relacionados a parte química foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) e a parte biológica foi avaliada no Laboratório de Sanidade Animal (LSA), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), ambos pertencentes à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

4.1 Coleta de material vegetal

Os cultivares de abóbora (*Cucurbita moschata*) foram coletados na Estação Experimental de Campos (EEC) na PESAGRO – RIO, área de convênio com a UENF localizada no município de Campos dos Goytacazes (Latitude = 21° 45' 15". Longitude = 41° 19' 28". Altitude = 13 m ao nível do mar), no mês de novembro de 2008. As sementes foram depositadas sob o código UENF1999 no Livro de Introdução do Banco de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.2 Análises de caracterização química

Análises de composição centesimal da abóbora já são abordadas na literatura, porém, a fim de aprofundar o conhecimento de algumas características da abóbora em estudo, realizou-se nesse trabalho as análises de umidade, lipídios, proteínas e carboidratos.

4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada por gravimetria e constou de pesagens de alíquotas com aproximadamente 5g de polpa de abóbora em placas de Petri. Cada placa era previamente tarada, adicionada da amostra e aquecida em estufa a vácuo a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ até a obtenção de peso constante (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata, utilizando uma única amostra e os resultados expressos em g de umidade/100g de matéria seca.

4.2.2 Lipídeos totais

A extração da fração lipídica foi realizada a temperatura ambiente de acordo com a metodologia preconizada por Bligh & Dyer que se baseia em uma extração com solventes a frio. A quantificação foi feita por gravimetria. Nos procedimentos metodológicos foram utilizadas alíquotas com 5g de polpa de abóbora e as proporções recomendadas dos seguintes solventes: clorofórmio, metanol e água nas proporções de 2:1:0,8, respectivamente. A fração lipídica da amostra fica retida na fase clorofórmica. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g de lipídeos totais/100g de amostra.

4.2.3 Nitrogênio total (proteínas)

Para determinação do nitrogênio total (NT) alíquotas com aproximadamente 2g de polpa de abóbora foram submetidas as etapas de

digestão, destilação e titulação de acordo com os procedimentos sugeridos pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) que mensura a concentração de nitrogênio total contido na amostra *in natura*. O teor de proteína foi calculado através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25 calculado a partir do perfil de aminoácidos da amostra (AOAC, 1995). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g de proteína total ou bruta/100g de amostra.

4.2.4 Açúcares redutores e totais (carboidratos)

Para a determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foi realizada a metodologia de oxi-redução de acordo com o método de Eynon Lane que consiste em um método titulométrico fundamentado na redução de íons cobre presentes em uma solução alcalina. As alíquotas utilizadas foram 15g de polpa de abóbora macerada. Os teores de açúcares foram calculados de acordo com o volume gasto na titulação e a diluição do Licor de Soxhlet. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g de açúcares redutores ou açúcares redutores totais/100g de amostra.

4.3 Preparo do extrato metanólico

Para o preparo do extrato metanólico, as polpas de abóbora (*Cucurbita moschata*) foram limpas, lavadas com água destilada e separadas as suas partes (casca, semente e polpa). As polpas foram submetidas a uma maceração com grau e pistilo sem nenhum solvente. Em seguida, as amostras foram liofilizadas no aparelho Liotop 202 até a completa secagem das mesmas. O extrato foi proveniente de uma extração estática com metanol 100% (10% p/v) dos frutos macerados (Figura 3) em temperatura ambiente durante 35 dias, sendo que, uma vez por semana, o solvente era filtrado e evaporado em banho-maria a 35°C, ao abrigo da luz (AOAC, 1995). Essa metodologia se baseou no protocolo de rotina empregado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA).

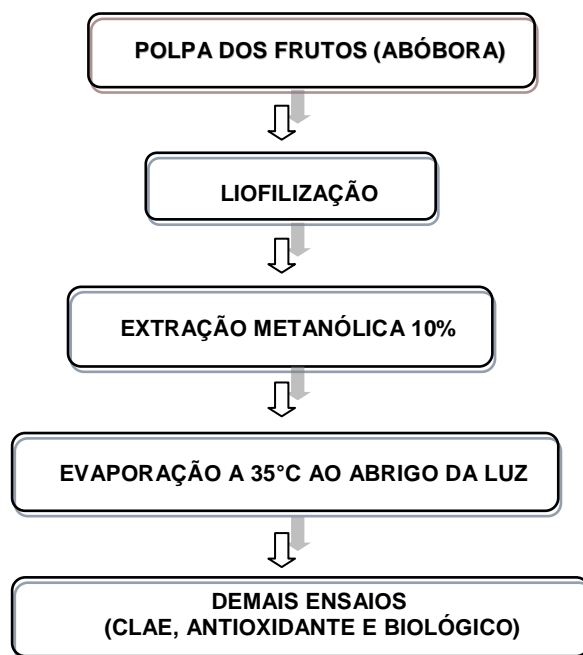


Figura 3: Esquema da obtenção do extrato metanólico da polpa de abóbora.

4.4 Fracionamento do extrato metanólico

O extrato foi, em princípio, avaliado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a qual se constitui numa técnica rápida e de baixo custo para uma análise qualitativa e semiquantitativa. Neste método cromatográfico, o solvente ou a mistura dos solventes utilizados como fase móvel devem ser cuidadosamente selecionados, pois terão papel fundamental na separação de misturas (Oliveira, 2005).

Foram usadas placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ em alumínio, espessura 0,2 mm da MERCK (20X20 cm). Estas foram cortadas com 4 cm de comprimento e as aplicações das amostras feitas a cerca de 0,7 cm acima da borda inferior da placa e 0,5 cm de distância das bordas laterais para a realização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A fase móvel utilizada foi butanol: ácido acético: água na proporção 3:1:1 respectivamente.

Após o desenvolvimento da cromatografia é necessário o uso de reveladores químicos e físicos (Sabudak et al., 2005). Neste caso as placas com sílica estão pré-impregnadas com material fluorescente, portanto, reveladas com lâmpada de UV em comprimentos de onda de 254 e 350 nm (método físico).

Como revelador químico utilizou-se a solução ácida de sulfato cérico, que para o seu preparo é necessário ácido sulfúrico concentrado (98%) e água (método químico). Depois de preparado, este revelador é borrifado na placa cromatográfica e, em seguida, a placa é aquecida exibindo manchas que são referentes às possíveis substâncias presentes na amostra.

Decorrida a análise por CCD, a amostra que ofereceu manchas de interesse foi fracionada por cromatografia em coluna para purificação e as frações oriundas foram acompanhadas por CCD seguindo o protocolo descrito anteriormente. As sílicas para a montagem das colunas para as cromatografias empregadas foram:

- *Sílica para cromatografia de fase reversa RP-2.* Consiste numa fase estacionária não-polar, e a fase móvel relativamente polar, o oposto do que ocorre no sistema cromatográfico de fase normal, no qual a fase estacionária é altamente polar, suportada em partículas de sílica, e a fase móvel é relativamente não-polar (Skoog, et al., 2002). Nesse estudo as fases móveis utilizadas foram concentrações que variavam de 0 a 100% de metanol e água destilada conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Sistema de solventes utilizado na cromatografia em coluna aberta aplicado nas frações.

Água (%)	Metanol (%)
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

- *Sílica para a cromatografia de exclusão por tamanho.* A sílica utilizada foi a *Sephadex LH-20*, a qual consiste de partículas pequenas de sílica (~10µm) ou de polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais moléculas do soluto e do solvente podem se difundir. Assim, moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são

excluídas e essencialmente não sofrerão retenção, sendo as primeiras a serem eluídas. Já as moléculas com diâmetro menores que dos poros podem penetrar pelo “emaranhado” de poros e ficar retidas por tempos maiores, sendo as últimas a serem eluídas (Skoog, et al., 2002).

A Figura 4 apresenta o fracionamento e purificação do extrato metanólico até a obtenção da substância isolada (B1), as colunas cromatográficas empregadas, bem como as subfrações resultantes e seus rendimentos. Este processo de fracionamento foi direcionado pelas placas em CCD, onde as frações eluídas da cromatografia em coluna aberta foram agrupadas em conjuntos de acordo com as manchas semelhantes entre em si.

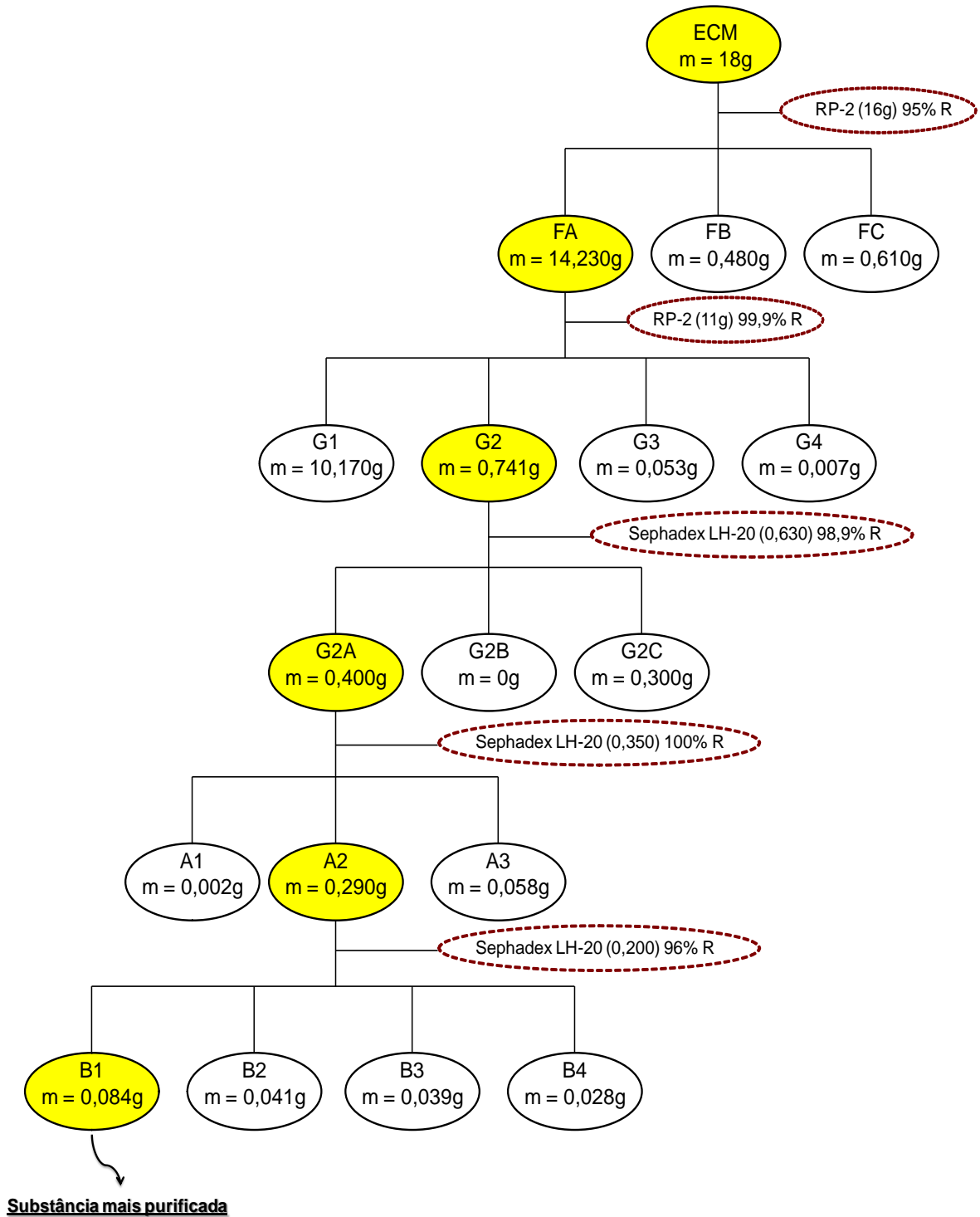


Figura 4: Esquema de fracionamento e purificação do extrato metanólico da polpa de abóbora.

Além desta, outras técnicas cromatográficas também foram empregadas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de se avaliar e estabelecer o perfil químico do extrato e das frações. Esta é uma técnica valiosa,

pois apresenta alta sensibilidade, resposta rápida aos solutos dependendo do detector utilizado, informação qualitativa do pico desejado entre outros fatores (Baggio e Bragagnolo, 2004).

As análises foram realizadas no equipamento Shimadzu Class, modelo LC-10, com duas bombas LC10AT, sendo a detecção feita nos comprimentos de onda fixos de 254 nm e 350 nm (detector por varredura de espectro ao ultravioleta por arranjo de fotodiodos SPD-M10A) e injetor Rheodyne 7725i com volume de injeção de 20 µL. Utilizou-se a coluna RP-18 da Macherey-Nagel (5µm, 4,0 x 250mm). O sistema de solvente foi água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,2) e acetonitrila com o gradiente de concentração conforme ilustrado na Tabela 3, usando fluxo de 1 mL/min . As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL (p/v).

Tabela 3: Sistema de gradiente utilizado para realização de CLAE.

Tempo (min)	Concentração de Água Acidificada (pH 3,5)	Acetonitrila
0	100	0
5	95	5
10	90	10
15	85	15
20	80	20
25	75	25
30	70	30
40	50	50
45	30	70
50	0	100
55	100	0

4.5 Atividade antioxidante

Certos métodos convenientes foram desenvolvidos para uma quantificação rápida, simples e confiável da capacidade antioxidante de vários tipos de amostras (Müller et al., 2011) incluindo o método de determinação da atividade

antioxidante pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Esta técnica foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras, reagem com o DPPH, que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical gerado é acompanhada de perda de cor e dessa forma indicar o potencial antioxidante do extrato (Ali et al., 2008).

Esta técnica consistiu em adicionar 1mL do extrato metanólico e das frações, em concentrações que variavam de 10 - 1000 µg/mL, à 1 mL de uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM), a reação se processou em 1 hora à temperatura ambiente. Imediatamente, a absorção do DPPH foi verificada no comprimento de onda de 515 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade sequestradora de radicais livres de cada extrato foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente do extrato (controle negativo) e uma solução de um padrão de substância aromática (controle positivo), o 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT). Posteriormente, foi calculado o percentual sequestrador (PS%) de radicais livres (Koleva et al., 2002). A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição da oxidação do radical e foi calculada mediante a seguinte fórmula (Roesler, et al., 2007).

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Extr}})/A_{\text{DPPH}})*100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorbância da amostra em solução.

4.6 Ensaios biológicos do extrato metanólico e frações

4.6.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram a bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e três cepas de *Staphylococcus aureus*: cepa-padrão ATCC 25923, ATCC 33591 e uma cepa clínica isolada de um paciente, cujas caracterizações estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos

<i>Micro-organismo</i>	<i>Grupo</i>	<i>Cepa</i>	<i>Procedência</i>
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 25923	Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - RJ
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	ATCC 33591	Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - RJ
<i>S. aureus</i>	Gram-positiva	Cepa clínica humana	Isolado de um paciente em um hospital de Campos
<i>S. epidermidis</i>	Gram-positiva	ATCC 12228	Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - RJ

4.6.1.1 Preparo dos inóculos

Staphylococcus sp.

As cepas de *Staphylococcus sp.* foram distintamente cultivadas em agar estoque (BHA-Brain Heart agar, Himedia, Índia), previamente reativadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Himedia, Índia) e levadas à estufa de crescimento bacteriológico (Quimis) a 37°C por 24 horas. A concentração inicial de cada inóculo foi obtida através da transferência de colônias ativadas para caldo BHI estéril até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração de 0,5 McF em fotômetro (Densimat®, bioMérieux, França), equipado com leitor para comprimento de onda 550 nm (Araújo et al., 2004).

4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato metanólico e das frações da polpa de abóbora, foi empregado o método da diluição em meio líquido, baseado na metodologia descrita por Lemos 1997.

O extrato metanólico e as frações FA, G2, G2A, A2 e B1 foram solubilizados em DMSO P.A. nas seguintes concentrações:

Tabela 5 – Concentração das amostras usadas no ensaio biológico

Amostra	Concentração
ECM	10 mg/200 μ L
FA	10 mg/200 μ L
G2	7 mg/200 μ L
G2A	6 mg/200 μ L
A2	5 mg/200 μ L
B1	4 mg/200 μ L

Em seguida, 10 μ L da amostra diluída foi adicionada a 170 μ L do meio Müller Highton (MH) líquido (Himedia, Índia) em eppendorfs, juntamente com um volume de 20 μ L de suspensão da bactéria utilizada, padronizada pela turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (inóculo). Após a incubação dos eppendorfs em estufa de crescimento bacteriano a 37°C por 6 horas, uma alíquota de 50 μ L do conteúdo de cada eppendorf foi semeado em placas de Petri contendo meio MH sólido (Himedia, Índia), conforme ilustra o esquema mostrado na Figura 5. Após o período de incubação das placas (em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C por 24 horas), foi identificada a presença ou não de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) obtidas em cada experimento, com subsequente comparação com o controle.

Os controles foram preparados de maneira similar ao extrato e frações, sendo que foi adicionado à 170 μ L de meio MH líquido e 20 μ L de inóculo, 10 μ L do antibiótico gentamicina na concentração de 200 μ g/mL como controle positivo,

e 10 μL do solvente DMSO P.A. como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

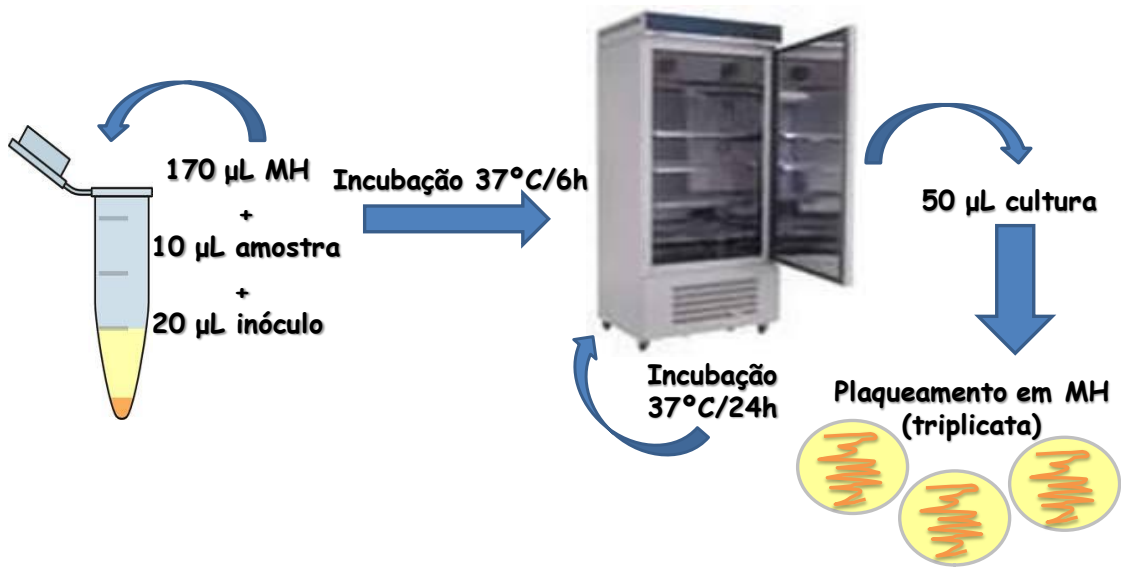


Figura 5: Esquema da atividade antimicrobiana do extrato metanólico e das frações da polpa de *Cucurbita moschata* pelo método da diluição em meio líquido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises físico-químicas

O conhecimento do teor dos compostos orgânicos de qualquer alimento é de suma importância para a população (Manhães, 2007). Sendo assim, foram avaliados nesse trabalho, o teor de umidade, lipídios, proteínas e carboidratos presentes na polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora). Os resultados encontrados nessas análises, bem como aqueles relatados na literatura encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Teores de umidade, lipídio, proteína e carboidrato da polpa da abóbora em termos percentuais (g/100g de amostra).

Análise	Média ± d.p.	Literatura Endef ¹	Literatura USDA ²	Literatura TBCA-USP ³	Literatura Alves,et al ⁴	Literatura Taco ⁵
Umidade	85,4 ± 0,5	88,3	91,6	93,4	88,23	95,7
Lipídio Total	0,08 ± 0,01	0,3	0,1	0,2	X	Tr
Proteína	0,9 ± 1,4	1,2	1,0	1,27	1,3	0,6
Carboidrato	3,05 ± 0,5	9,8	6,5	4,66	8,11	3,3

¹Tabela de Composição de Alimento do Endef/IBGE, 1999.

² Nutrient Database for Standard Reference,2001.

³Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2008.

⁴Alves, et al., 2010.

⁵Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - Taco, NEPA - Unicamp, 2011.

d.p. = desvio padrão

Tr = Traços

X = Não foi avaliado

O valor médio da umidade determinada a partir da polpa de abóbora foi $85,4 \pm 0,5$ g/100g de polpa. Ao comparar esse valor com os demais valores para teor de umidade encontrados na literatura, nota-se que o mesmo foi bem semelhante aos outros valores verificados na literatura (Tabela 6). O valor mínimo para umidade observado na literatura foi de 88,23 g/100g (Alves et al., 2010), e o valor máximo mostrado foi de 95,7 g/100g (Taco, 2011), porém dois valores intermediários de teores de umidade que são citados acima estão bem próximos: 88,3g/100g (Endef, 1999) e 88,23g/100g (Alves et al., 2010). Fazendo-se uma estimativa de todos os resultados observados na literatura, o teor de umidade da abóbora seria em torno de 91,44g por 100g de amostra (d.p.= 3,2g), valor este próximo ao encontrado no presente trabalho (85,4g/100g).

Para o teor de lipídios totais (Tabela 6), foi verificado o valor de $0,08 \pm 0,01$ g/100g de polpa de abóbora. Assim, o teor de lipídios totais encontrados nesse experimento foi inferior ao demais dados da literatura mostrados na Tabela 5. No entanto, esse valor encontra-se bem próximo ao valor encontrado por USDA, 2001 (0,1 g/100g) e pode ser assemelhado também ao valor observado pela tabela Taco, 2011, já que esta indica que a abóbora apresenta apenas traços de lipídios em sua composição, assim como determinado nesse trabalho. Os teores de lipídios totais de acordo com os encontrados na literatura estão bem próximos uns dos outros, porém, o maior teor de lipídios encontrado nos dados da literatura foi de 0,3 g/100g (Endef, 1999) e o menor valor foi de 0,1 g/100g (USDA, 2001). Ao se comparar todos os dados mostrados na literatura, têm-se uma média de 0,2 g de lipídios por 100g de amostra (d.p.= 0,1g), valor este maior ao encontrado no presente trabalho (0,08 g/100g). Essa diferença pode ter sido ocasionada por alguma alteração de um ponto crítico durante a realização do experimento.

O teor médio de proteínas encontrado na polpa de abóbora foi de $0,9 \pm 1,4$ g de proteínas por 100g de amostra analisada (Tabela 6). Este valor encontra-se próximo dos demais valores apresentados nos dados colhidos da literatura, exceto para o valor mostrado em Taco, 2011 (0,6g/100g). O maior valor de proteína encontrado na literatura é de 1,3 g/100g (Alves et al., 2010) e o menor é de 0,6 g/100g (Taco, 2011). Ao se fazer uma média de todos os valores relatados na literatura obtém uma média de 1,07g de proteínas por 100 g de amostra (d.p.= 0,3g), sendo tal valor semelhante ao determinado no presente trabalho (0,9 g/100g), indicando assim que os resultados para essa análise também foram bastante satisfatórios.

A média do teor de carboidratos totais da polpa de abóbora foi de $3,05 \pm 0,5$ g de carboidratos por 100g de polpa de abóbora (Tabela 6). Tendo como comparação os valores de carboidratos citados na literatura e listados na Tabela 5, observa-se que o valor encontrado no presente trabalho é inferior aos demais dados, no entanto, encontra-se bem próximo ao valor relatado em Taco, 2011 (3,3g/100g). Em geral, todos os dados da literatura estão dispersos entre si, porém, o maior teor de carboidrato mostrado foi o de Endef, 1999 (9,8g/100g), enquanto que o menor valor foi demonstrado por Taco, 2011 (3,3g/100g). Ao se fazer uma média de todos os valores que são verificados na literatura têm-se 6,5 g de carboidrato por 100g de amostra (d.p.= 2,6g). Este valor é superior ao encontrado neste trabalho, no entanto, por ser semelhante ao valor descrito na tabela Taco, 2011, este o resultado torna-se aceitável já que esta tabela é utilizada como referência em diversos trabalhos acadêmicos.

5.2 Análises cromatográficas

Tanto o extrato bruto de *Cucurbita moschata* (abóbora), quanto todas as frações oriundas do fracionamento desse extrato através de Cromatografias em Coluna (RP-2 e *Sephadex*) foram analisados também de acordo com mais dois tipos de cromatografias: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Vale ressaltar que este estudo foi bioguiado e, portanto, o fracionamento foi realizado de acordo com os resultados obtidos nos ensaios biológicos.

5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Em princípio, as frações oriundas da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora) foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O sistema de solventes empregado foi o baw 3:1:1 (baw - butanol: ácido acético: água, respectivamente), sendo esse sistema o mais satisfatório dentre todos os sistemas testados, já que houve uma melhor separação das substâncias. As placas de CCD foram reveladas com sulfato cérico.

Na Figura 6 está mostrada a CCD das principais frações oriundas do fracionamento do Extrato Bruto (ECM): ECM, FA, G2, G2A, A2 e B1. A fração ECM é referente ao extrato metanólico da abóbora, FA é a fração aquosa oriunda do fracionamento de ECM em coluna cromatográfica aberta de fase reversa RP-2, G2 é a fração vinda do fracionamento FA em coluna cromatográfica aberta de fase reversa RP-2, G2A é fração que foi originada pelo fracionamento de G2 em coluna de Cromatografia por Exclusão de Tamanho de Partícula *Sephadex* LH-20, a fração A2 é oriunda do fracionamento de G2A em *Sephadex* LH-20, e por fim, a fração B1 que é fração vinda do fracionamento de G2A também em *Sephadex* LH-20.

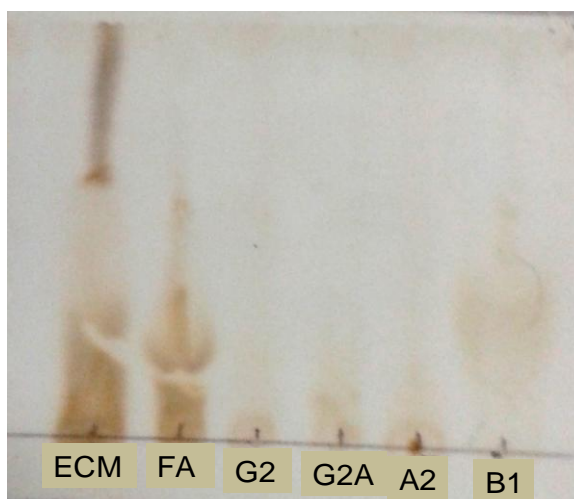


Figura 6: Cromatograma em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e das frações obtidas a partir da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora), mostrando as manchas características. Fase móvel: butanol: ácido acético: água (3:1:1) e revelado com sulfato cérico.

Como B1 foi a fração que se mostrou mais purificada, sua CCD é melhor representada na Figura 7. De acordo com esta CCD (Figura 7), pode-se notar que a mancha predominante possui o fator de referência (Rf) com valor igual a 0,45, que sob revelação em luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 332 nm apresenta coloração azul-arroxeadada. Este valor de Rf (0,45) indica que esta mancha possui características mais polares de acordo com o sistema de solventes utilizado (baw 3:1:1) para eluição das placas cromatográficas.

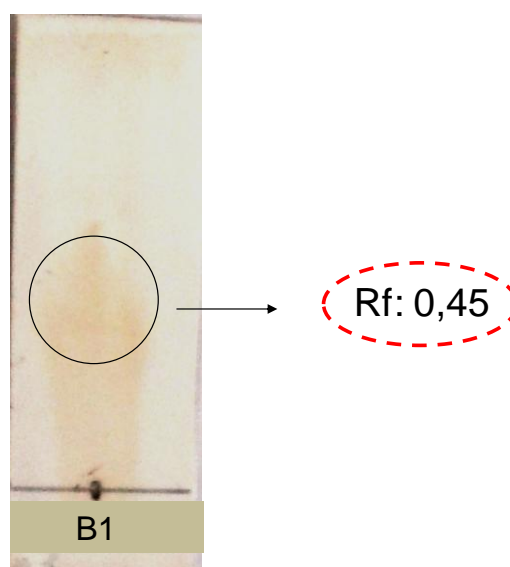


Figura 7: Cromatograma em Camada Delgada (CCD) da fração B1 da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora). Fase móvel: butanol: ácido acético: água (3:1:1) e revelado com sulfato cérico.

5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o propósito de conhecer o perfil químico do extrato e frações da abóbora, estes foram submetidos a uma outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Essa técnica desempenha um papel central na separação de misturas complexas, como substâncias do metabolismo primário ou secundário a partir de fontes vegetais. Estudos quanto ao tempo de retenção (Tr) em diferentes suportes e eluentes têm sido aperfeiçoados e tabelados, a fim de se obter condições ótimas de análise (Oliveira, 2005).

Foram submetidas à análise por CLAE para o conhecimento acerca do seu perfil químico, o Extrato Metanólico Bruto (ECM), e as frações FA, G2, G2A, A2 e B1 de *Cucurbita moschata*.

5.2.2.1 Cromatograma do extrato bruto metanólico (ECM)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), produzida a partir do extrato bruto metanólico (ECM), mostrou um pico majoritário, que está destacado na Figura 8 no tempo de retenção em 3,499 minutos (circulado) no comprimento de onda de 254 nm. O espectro de ultravioleta (UV) referente a este pico revelam as bandas de absorção em aproximadamente 240 e 270 nm (Figura 8).

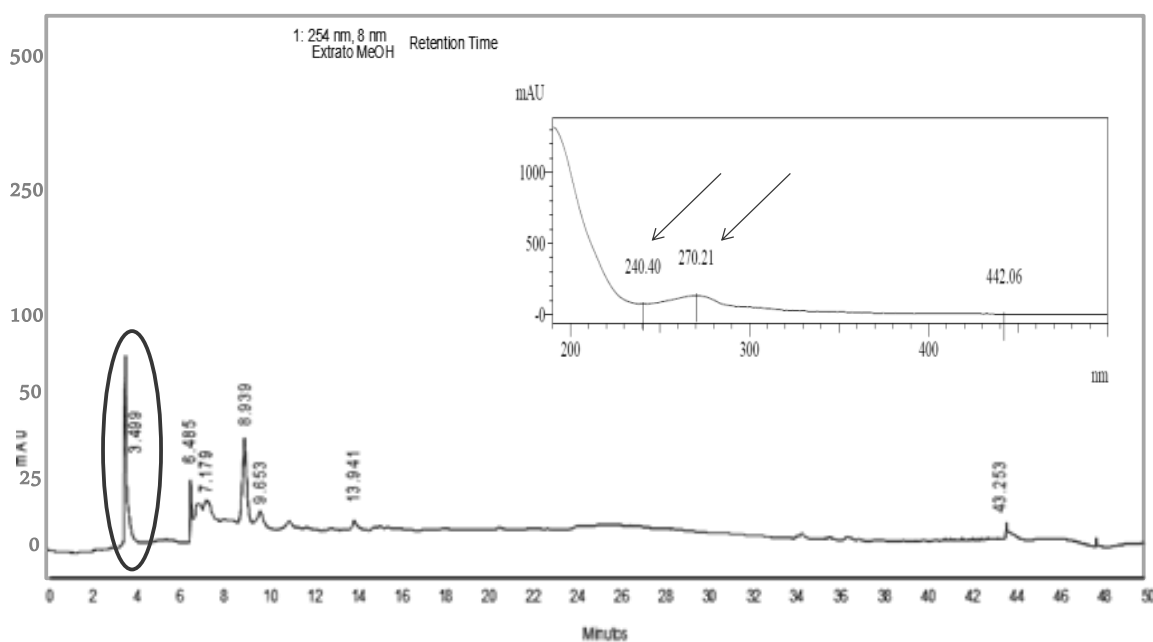


Figura 8: Cromatograma do perfil químico do Extrato Metanólico Bruto (ECM) oriundo de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm, e o espectro de UV do pico de retenção de 3,499 minutos.

A Tabela 7 mostra que o pico referente ao tempo de retenção de 3,499 minutos é o pico majoritário do extrato bruto metanólico da polpa da abóbora, e este pico possui uma área de 1.392.218 nm². No entanto, como pode ser observado (Figura 8), outros seis picos são notórios nesse cromatograma, porém,

estes parecem estar menos concentrados na amostra em questão (ECM), como pode ser verificado na Tabela 7, cujas áreas são inferiores.

Tabela 7: Área do perfil químico do Extrato Metanólico Bruto (ECM) oriundo de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,499	1.392.218	96.365
2	6,485	1.004.721	44.986
3	7,179	900.845	37.293
4	8,939	1.156.889	67.014
5	9,653	638.749	21.093
6	13,941	604.276	20.857
7	43,253	769.003	25.584

5.2.2.2 Cromatograma da fração FA

A primeira fração oriunda do extrato bruto (ECM) da abóbora (ativo nos ensaios biológicos) foi a fração FA, que mostrou inibição no crescimento bacteriano. Esta é uma fração 100% aquosa que foi proveniente do fracionamento do extrato bruto realizado em uma coluna aberta em fase reversa RP-2. A Figura 9 mostra o perfil químico da fração FA e o espectro de UV do pico de retenção em 3,488 minutos.

Através desse cromatograma, observa-se que o pico majoritário do Extrato Bruto se manteve em FA no tempo de retenção de 3,488 minutos (circulado), já que os picos entre 8 a 25 minutos podem estar levemente aumentados pela presença de ácidos carboxílicos (Sayago et al., 2007; Singh et al., 2005; Waksmundzka-Hajnos, 1998), uma vez que FA é exclusivamente aquosa. O espectro de UV desse pico também é mostrado na Figura 9 revelando bandas de absorção em aproximadamente 240 e 270 nm, assim como do espectro de UV do pico majoritário do Extrato Bruto (Figura 8).

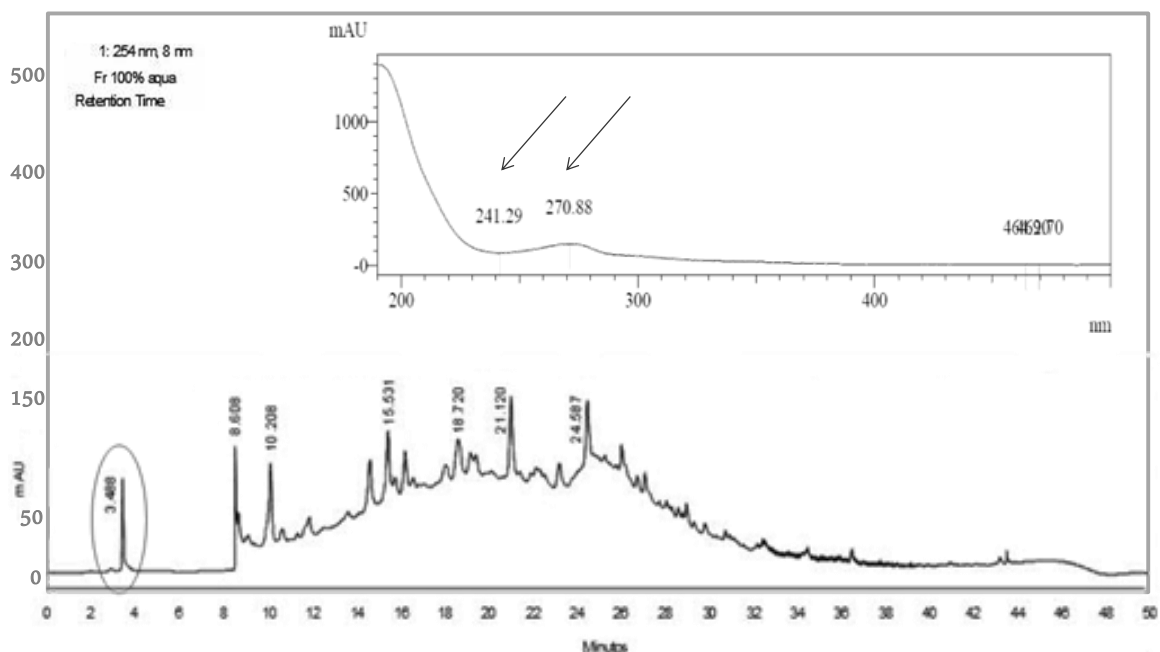


Figura 9: Cromatograma do perfil químico da fração FA (fração 100% aquosa) oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,488 minutos.

A Tabela 8 mostra que o pico de retenção de 3,488 minutos de FA possui uma área de 1.576.240 nm².

Tabela 8: Área do pico majoritário no tempo de 3,488 minutos do cromatograma do perfil químico da fração FA oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,488	1.576.240	104.957

5.2.2.3 Cromatograma da fração G2

A próxima fração analisada foi a fração G2, sobretudo por ter apresentado ausência de crescimento microbiano. Esta fração foi proveniente do fracionamento da fração anterior (FA), a qual foi aplicada em uma coluna de fase reversa RP-2 e resultou em 4 subfrações (G1, G2, G3 e G4). De acordo com o perfil químico dessas subfrações (dados não mostrados), a que mostrou os picos de maior interesse foi G2. O perfil químico de G2 (Figura 10), mostrou três picos,

um em torno de 3 minutos, outro próximo de 9 minutos e o terceiro em aproximadamente 14 minutos. O espectro de UV do pico de retenção com tempo de 3,376 minutos, se mostrou muito semelhante ao perfil observado para FA (Figura 9) e ECM (Figura 8), com duas bandas de absorção em aproximadamente 240 e 270 nm.

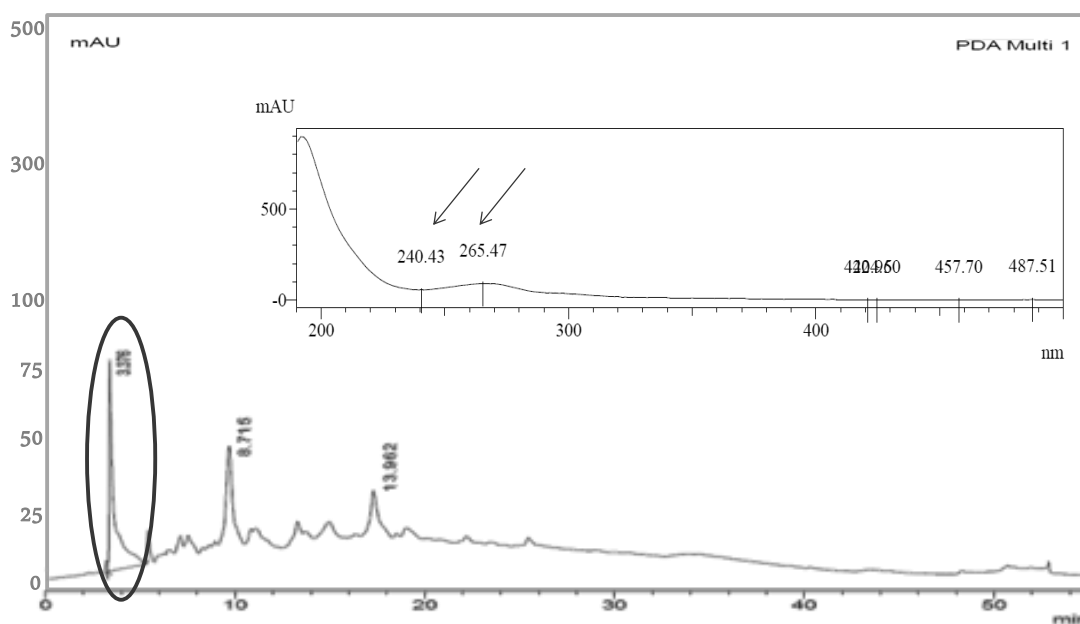


Figura 10: Cromatograma do perfil químico da fração G2 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,376 minutos.

A Tabela 9 mostra que o pico de retenção de 3,376 minutos de G2 possui uma área de 1.361.094 nm², e os outros dois se apresentam menos concentrados.

Tabela 9: Área dos picos listados no cromatograma do perfil químico da fração G2 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,376	1.592.751	74.770
2	8,715	1.444.940	41.745
3	13,962	1.153.141	22.750

5.2.2.4 Cromatograma da fração G2A

Seguindo a ordem de fracionamento, a próxima fração analisada foi G2A, essa fração resultou da aplicação da fração G2 em uma coluna aberta de Cromatografia por Exclusão de Tamanho de Partícula (*Sephadex* LH-20). Desse fracionamento resultaram três sub-frações: G2A, G2B e G2C. Porém a fração G2A foi a que apresentou o pico majoritário em torno de 3 minutos, e inibição de crescimento bacteriano. O seu perfil químico é ilustrado na Figura 11.

De acordo com a Figura 11, o pico majoritário presente na fração G2A é o mesmo pico que estava sendo apresentado nas amostras anteriores (ECM, FA, G2). Este pico se encontra no tempo de retenção de 3,302 minutos (destacado) e seu espectro de UV é mostrado na Figura 11, com as bandas de absorção em aproximadamente 237 e 263 nm. É notável ainda que à medida que a amostra vai sendo purificada, esse pico se concentra, ou seja, se verifica maior absorção, que pode ser evidenciada pela área referente à este pico.

Nesta fração também são observados mais 2 picos em destaque nos tempos de 9,434 e 16,903 minutos. Esses dois últimos picos provavelmente são referentes aos picos que também foram destacados no cromatograma da Figura 10, embora não tenham sido listados.

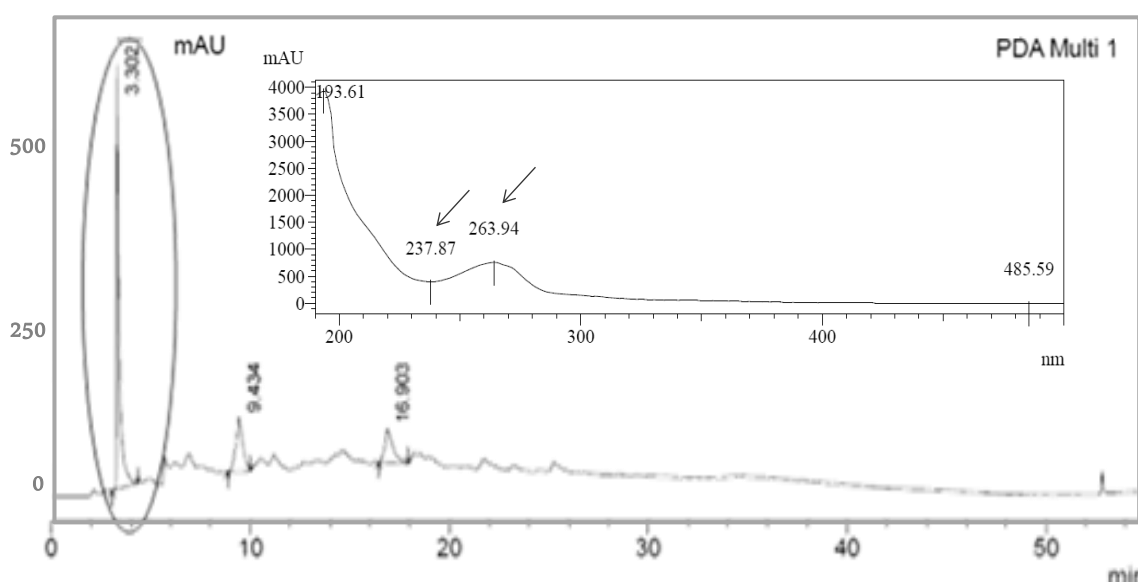


Figura 11: Cromatograma do perfil químico da fração G2A oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,302 minutos.

A Tabela 10 mostra que o pico de retenção de 3,302 minutos de G2A possui uma área de 5.639.642 nm², e muito superior ao observado para os outros dois picos (9,434 e 16,903 minutos).

Tabela 10: Área dos picos listados do cromatograma do perfil químico da fração G2A de oriunda *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,302	5.639.642	637.016
2	9,434	2.013.368	81.746
3	16,903	1.405.262	50.866

5.2.2.5 Cromatograma da fração A2

A próxima fração estudada foi a fração A2 que é resultante do fracionamento da fração G2A em uma Coluna Aberta *Sephadex* LH-20, em que foram resultante três frações (A1, A2 e A3). De acordo com o perfil químico dessas frações (dados não apresentados), a fração que mostrou o pico majoritário foi A2 (Figura 12).

Como é claramente mostrado na Figura 12, o pico majoritário do cromatograma é o pico com o tempo de retenção no tempo de 3,300 minutos. Este pico é o mesmo que aparece nos demais cromatogramas analisados até o momento. O espectro de UV desse pico também é apresentado na Figura 12 com bandas de absorção nos tempos de 239 e 264 nm.

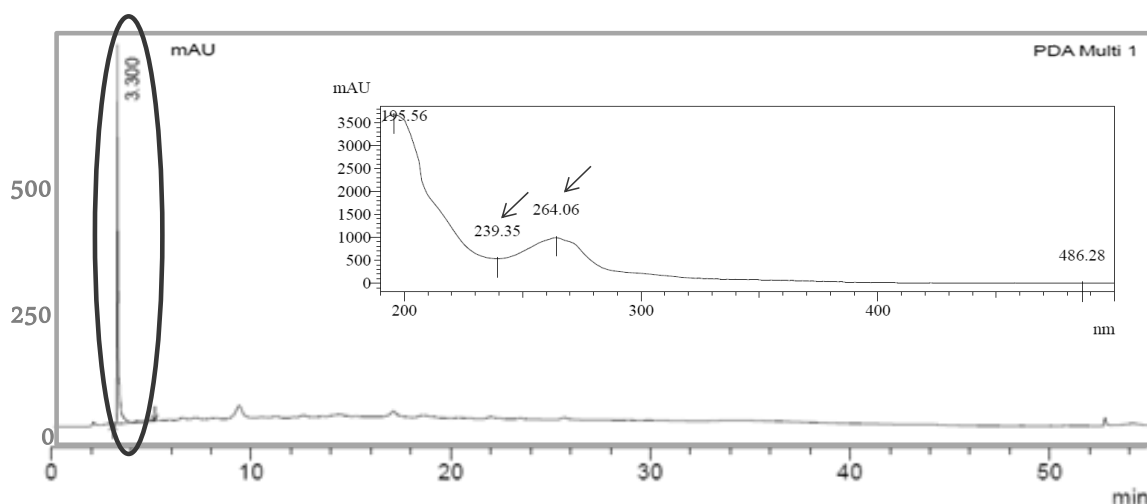


Figura 12: Cromatograma do perfil químico da fração A2 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,300 minutos.

A Tabela 11 mostra que o pico de retenção de 3,300 minutos da fração A2 possui uma área de 3.083.601 nm².

Tabela 11: Área do pico majoritário no tempo de 3,300 minutos do cromatograma do perfil químico da fração A2 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,302	3.083.601	872.689

5.2.2.5 Cromatograma da fração B1

A última fração estudada foi a fração B1, essa fração é resultante da aplicação da fração A2 em uma Coluna Aberta de Cromatografia por Exclusão de Tamanho de Partícula *Sephadex* LH-20. Deste fracionamento resultaram quatro frações: B1, B2, B3 e B4. Porém, B1 foi a que apresentou um cromatograma menos complexo. O pico de retenção no tempo de aproximadamente 3 minutos.

Deve-se tratar do mesmo pico que é o mesmo que vinha sendo observado desde o extrato bruto (ECM- Figura 8). O cromatograma é ilustrado na Figura 13.

De acordo com a Figura 13, o pico majoritário presente na fração B1 se encontra no tempo de retenção de 3,412 minutos (destacado), e o seu espectro de UV com as bandas de absorção em aproximadamente 239 e 264 nm.

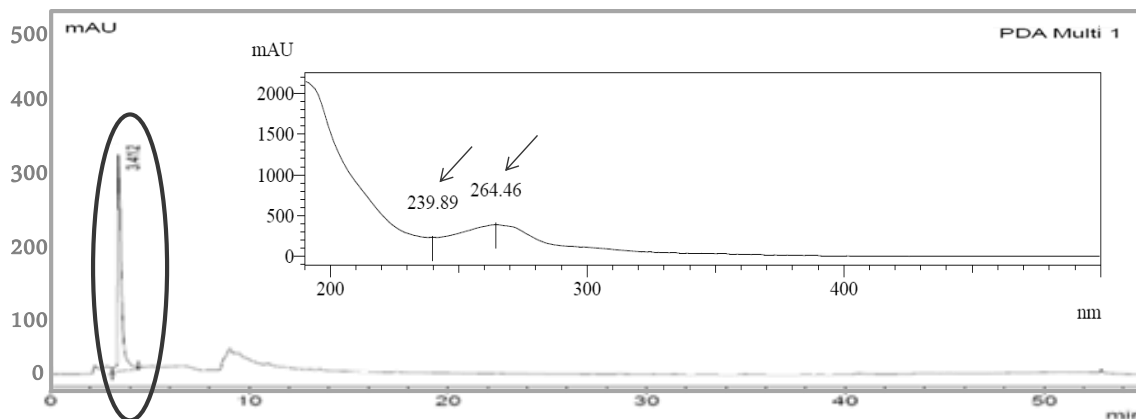


Figura 13: Cromatograma do perfil químico da fração B1 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm e espectro de UV do pico de retenção de 3,412 minutos.

A Tabela 12 mostra que o pico de retenção de 3,412 minutos de B1 possui uma área de 3.853.140 nm².

Tabela 12: Área do pico majoritário no tempo de 3,412 minutos do cromatograma do perfil químico da fração B1 oriunda de *Cucurbita moschata* (abóbora) avaliado por CLAE no comprimento de onda de 254 nm.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Área (nm ²)	Altura (nm)
1	3,412	3.853.140	315.707

Conforme visto até aqui, o pico de interesse, ou seja, aquele que apareceu em todos os cromatogramas, se encontra no tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos (de 3,300 a 3,499 minutos) e seu espectro de UV apresenta comprimento de onda que varia entre 240 e 270 nm. De acordo com dados na literatura, espectros de UV com comprimento de onda entre 240 e 270 nm podem estar relacionados à compostos fenólicos, ácidos aromáticos ou ainda hidrocarbonetos (Yang et al., 2011; Silverstein e Webster, 2001; Waksmundzka-Hajnos, 1998). Porém, de acordo com as condições cromatográficas empregadas,

imagina-se que esta trata-se de uma substância fenólica ou um ácido aromático (Silverstein e Webster, 2001).

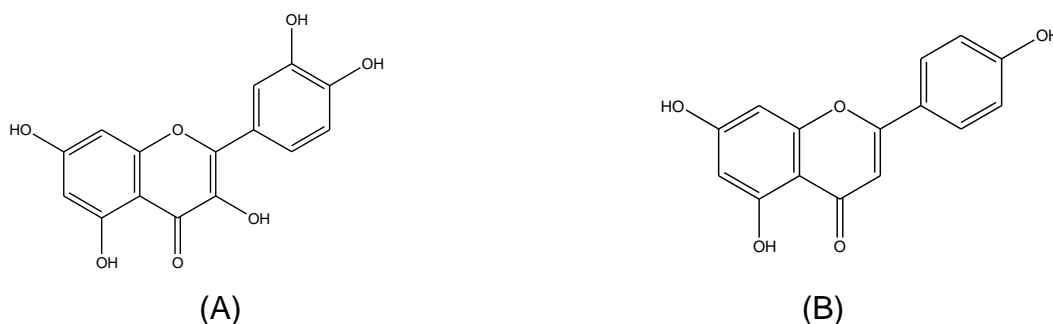
Para a elucidação estrutural da substância referente a esse pico seriam necessárias técnicas para auxiliar na sua identificação como os métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), ou ainda Espectrometria de Massas (EM) ou Infravermelho (IV) porém, como não havia mais massa suficiente da amostra em questão, essas técnicas não puderam ser concluídas, e assim não se pôde efetivar a elucidação estrutural completa da substância mais purificada nesse trabalho de Dissertação de Mestrado.

5.3 Atividade antioxidante (método do DPPH)

Com o intuito de se verificar a capacidade antioxidante do extrato metanólico bruto e das frações oriundas da polpa de *Cucurbita moschata*, estes foram submetidos à avaliação através do sequestro do radical livre estável DPPH, por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível.

Os resultados do extrato metanólico (ECM), das frações, bem como de B1 (substância mais purificada), e dos padrões quercetina, rutina, apigenina, ácido ascórbico e o padrão comercial BHT (butil-hidroxi-tolueno) submetidos ao ensaio antioxidante são mostrados na Tabela 12. Vale ressaltar que os testes foram realizados em triplicata, e em três concentrações distintas (1000, 100 e 10 µg/mL), sendo apresentadas aqui as médias aritméticas e o desvio padrão.

Os flavonóides foram utilizados como padrões pelo seu efeito protetor nos sistemas biológicos, o qual é conferido à sua capacidade de transferência de elétrons dos radicais livres (Heim, 2002), e estes são utilizados para balizar as amostras testadas (Figura 14).



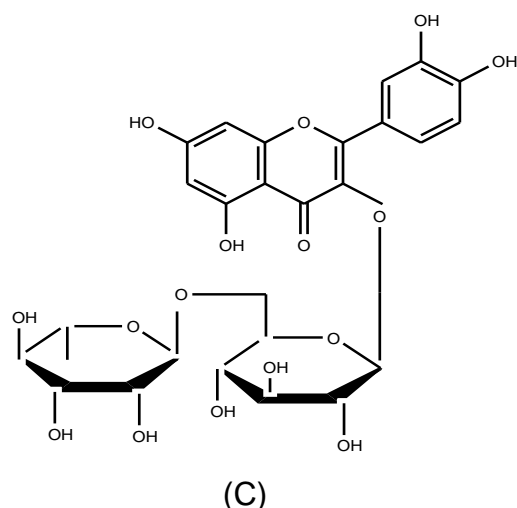


Figura 14: Estrutura química da quercetina (A), da apigenina (B) e da rutina (C).

De acordo com Ross e Kasum (2002) a propriedade antioxidante dos flavonóides está relacionada com sua estrutura, e os flavonóides que se apresentam hidroxilados, principalmente nas posições com os grupos 3-OH, 5-OH, 7-OH, 4'-OH e 3'-OH são os que apresentam maior propriedade antioxidante. Com isso, o poder antioxidante desses metabólitos se deve a facilidade com que um átomo de hidrogênio, a partir de uma hidroxila do anel aromático, pode ser doado para um radical livre. E a capacidade de um composto aromático em estabilizar um elétron não emparelhado (Figura 15).

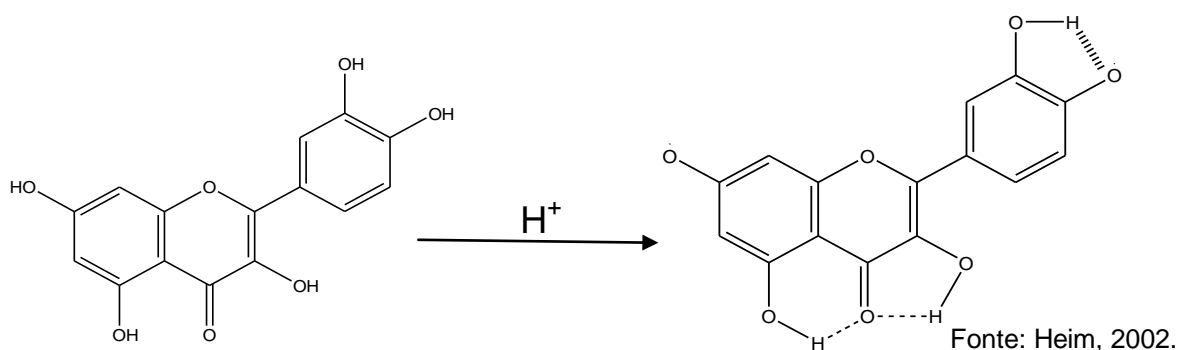
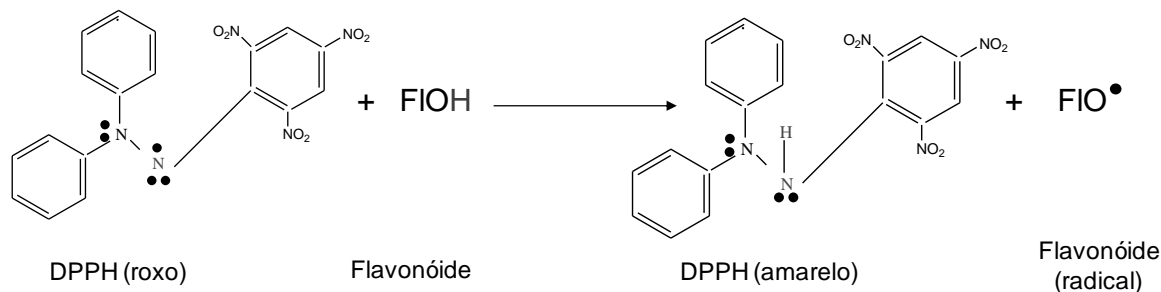


Figura 15: Mecanismo mostrando um composto aromático aceitando um elétron não emparelhado.

Os resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 13) mostraram que a quercetina apresentou maior atividade antioxidante que a rutina e a apigenina nas

três concentrações estudadas. Isso ocorre devido à quercetina (Figura 14 - A) ser um flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, e a perda ou doação de um de seus hidrogênios faz com que a molécula se estabilize por ressonância (Cuyckens & Claeys, 2004). Já a rutina (Figura 14 - C) possui uma estrutura semelhante à da quercetina, mas com uma substituição glicosídica em uma das hidroxilas e, por essa razão, apresenta uma menor atividade. Enquanto que a apigenina (Figura 14 - B), apresenta hidroxila nos carbonos 5, 7 e 4', porém esta aglicona não apresenta o grupo OH nos demais carbonos, fato este que também pode explicar a sua menor capacidade antioxidante (Rice-Evans, et al., 1996). Esse fato demonstra a sensibilidade do método do DPPH para determinação da atividade antioxidante frente a pequenas alterações na estrutura da molécula (Duarte-Almeida et al., 2006).

As reações com o DPPH envolvem a transferência de hidrogênio, sendo que um fator determinante para a velocidade de reação consiste na transferência de elétrons para o DPPH conforme ilustra a Figura 16. A abstração do átomo de hidrogênio do grupo FIOH (flavonóide ou substância fenólica, por exemplo) pelo DPPH, provém de uma reação secundária (Huang et al., 2005; Amié et al., 2003).



Fonte: Oliveira, 2005.

Figura 16: Reação entre o DPPH e um flavonóide.

Não só a quercetina, mas também a rutina e a apigenina são compostos fenólicos comumente encontrados em alimentos. Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixas concentrações, sejam capazes de impedir, retardar, ou ainda prevenir a auto-oxidação ou a oxidação mediada por radicais livres, e sobretudo que o produto formado após a reação seja estável (Duarte-Almeida et al., 2006, Behling et al., 2006).

O ácido ascórbico ou vitamina C (Figura 17) é amplamente conhecido por sua atividade antioxidante, e por isso é utilizado em cosméticos ou em tratamentos de doenças degenerativas devido a sua capacidade em sequestrar radicais livres (Duarte-Almeida et al., 2006). Esse composto também está presente nos vegetais de uma maneira geral. Ele apresenta uma potente capacidade antioxidante, visto que sua molécula, que é polar e está localizada em compartimentos aquosos, sofre oxidação antes que outras moléculas se oxidem, impedindo e protegendo essas outras moléculas da oxidação (Costa e Rosa, 2006).

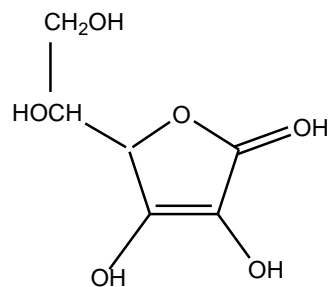


Figura 17: Estrutura química do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico ou vitamina C desempenha inúmeros papéis metabólicos no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas, ou nas formas livres no organismo. Por ser um bom agente redutor o ascorbato (Figura 18) pode ser oxidado pela maioria das espécies reativas de oxigênio que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (Barreiros et al., 2006).

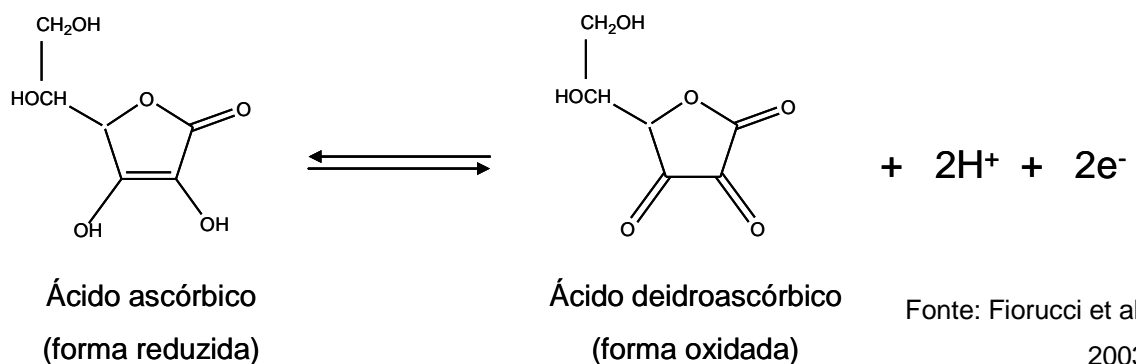


Figura 18: Oxidação do ácido ascórbico em deidroascórbico.

O padrão comercial BHT (Figura 19) é um antioxidante artificial comumente utilizado como padrão nas avaliações quanto as atividades antioxidantes por ser mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes (Ramalho e Jorge, 2006).

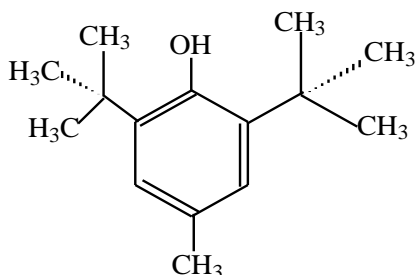
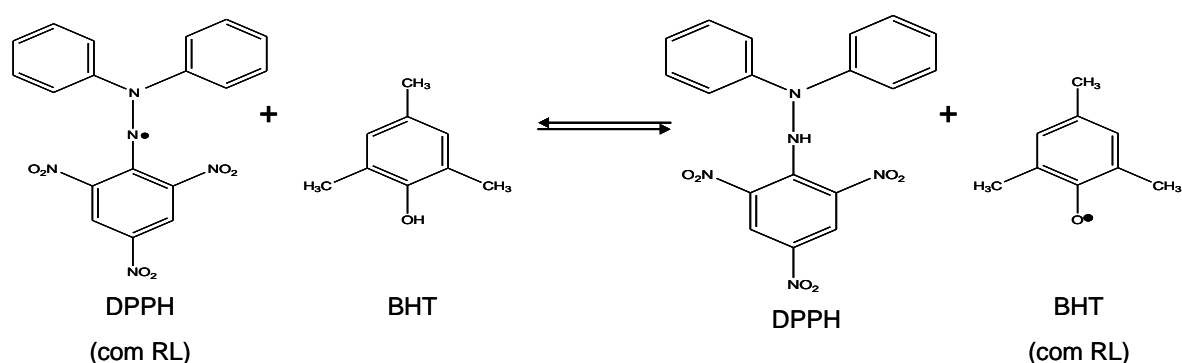


Figura 19: Estrutura química do antioxidante comercial BHT.

O BHT (Figura 19) foi escolhido para esse trabalho por ser um antioxidante sintético amplamente utilizado na indústria alimentícia e este padrão apresentou atividade sequestradora de radicais livres apenas na maior concentração (1000 µg/mL) neste trabalho, devido sua pouca polaridade (Duarte-Almeida et al., 2006, Ramalho e Jorge, 2006). O mecanismo de ação desse padrão é mostrado na Figura 20.



Fonte: Oliveira et al., 2009.

Figura 20: Reação química entre o radical DPPH e o BHT.

Tabela 13: Atividade antioxidante pelo método do DPPH do extrato metanólico, frações e dos padrões fenólicos quercetina, rutina, apigenina, além do ácido ascórbico e 2,6-di-(tert-butil)-4-metilfenol (BHT).

Espécies vegetais	Concentrações		
	1000 µg/mL (%)	100 µg/mL (%)	10 µg/mL (%)
Extrato Metanólico	83,6 ± 4,2	34,3 ± 1,2	9,1 ± 7,5
FA	100 ± 6,3	69,4 ± 9,5	8,3 ± 1,8
G2	100 ± 0,3	74,1 ± 5,6	12 ± 3,1
G2A	100 ± 0,0	100 ± 2,4	92 ± 4,6
A2	83,4 ± 0,7	24,6 ± 1,2	11,8 ± 0,4
B1	79,9 ± 3,0	9,5 ± 0,0	3,5 ± 2,1
Quercetina	95,3 ± 0,9	93,4 ± 1,2	91,3 ± 3,0
Rutina	88 ± 0,9	86,4 ± 1,1	0,8 ± 0,9
Apigenina	60 ± 1,5	41,3 ± 2,7	9,5 ± 1,0
Ácido ascórbico	95,6 ± 1,1	93,3 ± 2,7	92,7 ± 1,5
BHT	100 ± 0,9	52,1 ± 2,2	43,6 ± 1,5

*Média ± Desvio Padrão (n=3).

De acordo com os dados mostrados na Tabela acima, pode-se notar que todas as amostras provenientes da polpa de abóbora foram ativas na concentração mais alta.

O extrato metanólico bruto quando comparado com as demais frações, foi mais ativo apenas na concentração mais alta e, observa-se que o extrato apresenta atividade antioxidante semelhante as frações A2 e B1, e inferior as outras frações (FA, G2, G2A). Em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, na maior concentração analisada, a sequência seria: FA = G2 = G2A > Extrato metanólico > A2 > B1. Quando comparado à atividade antioxidante do extrato metanólico com a dos padrões utilizados, observa-se que, para quercetina, ácido ascórbico e BHT, a atividade do extrato foi inferior nas três concentrações analisadas.

Verificando os resultados do padrão rutina, notou-se que, em relação a esse padrão, o extrato metanólico apresentou uma atividade sequestradora de radicais livres semelhante na maior concentração analisada (1000 µg/mL). E para o padrão apigenina, o extrato metanólico mostrou-se mais eficaz no sequestro de radicais livres na maior concentração (1000 µg/mL), e para as demais concentrações: 100 e 10 µg/mL, não se observam atividade.

A fração 100% aquosa (FA) mostrou uma ótima atividade antioxidante na maior concentração analisada (1000 µg/mL), atividade essa igual a 100%. Nas demais concentrações analisadas (100 e 10 µg/mL) o poder antioxidante foi de 69,4 e 8,3% respectivamente. Comparando esses valores de atividade antioxidante com a dos padrões utilizados, nota-se que na maior concentração o poder de sequestro de radicais livres foi superior a rutina e a apigenina, muito semelhante aos padrões quercetina e ácido ascórbico, e igual ao do padrão comercial BHT. Para a concentração intermediária (100 µg/mL), a atividade antioxidante de FA foi em geral menor que a dos padrões estudados, com exceção dos padrões apigenina e BHT. Além disso, na menor concentração (10 µg/mL) não se verifica sequestro de radicais livres (atividade antioxidante).

Quanto à fração G2, é notável sua atividade antioxidante na maior concentração analisada (100%). Nas concentrações de 100 e 10 µg/mL a atividade encontrada foi de 74,1 e 12%. Ao se comparar os valores da atividade antioxidante com os dos padrões analisados, observa-se que os resultados são parecidos com a fração anterior (FA), onde na maior concentração a atividade também foi superior a rutina e apigenina, muito semelhante à quercetina e ao ácido ascórbico, e igual ao BHT (100%).

O padrão comercial BHT apresentou atividade sequestradora de radicais livres apenas na maior concentração (1000 µg/mL), discreta atividade (52%) na concentração intermediária e perda de atividade na concentração mais baixa. A fração G2 nas demais concentrações avaliadas apresentou uma atividade maior que a dos padrões BHT e apigenina na concentração de 100 µg/mL, um menor potencial antioxidante, do que os padrões quercetina, rutina e ácido ascórbico na concentração de 10 µg/mL, e uma perda de atividade para G2 nesta concentração mais baixa.

De todas as frações estudadas, a próxima fração (G2A) foi a que apresentou os melhores resultados para atividade antioxidante, com valores de atividade antioxidante superiores a 90% nas três concentrações analisadas (100, 100 e 92% de poder antioxidante nas concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL, respectivamente). Os resultados obtidos para essa fração foram superiores ou muito semelhantes a todos os padrões analisados. Esses dados podem ser facilmente comparados com o padrão fenólico quercetina que também mostrou um poder antioxidante superior a 90% nas três concentrações avaliadas.

A última fração estudada (B1) foi a que apresentou os menores valores observados quanto ao poder antioxidante. Sua atividade foi de 79,9, 9,5 e 3,5% para as seguintes concentrações: 1000, 100 e 10 µg/mL. Ao se comparar esses dados com os padrões analisados, têm-se que a atividade antioxidante de B1 é menor que a de todos os padrões, exceto para apigenina na maior concentração (60%).

5.4 Atividade antibacteriana

É importante ressaltar que esses são os primeiros ensaios realizados a partir da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*) utilizando seu extrato metanólico bruto e frações oriundas desse extrato na inibição de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As amostras foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana em diluição em meio líquido e foi observada se as mesmas atingiam a Concentração Mínima Inibitória (CMI ou CMI50), ou seja, que apresentem um número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) entre trinta e trezentos.

Concentração Mínima Inibitória é quando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste, de forma que, quanto menor o CMI, maior o potencial antimicrobiano do extrato e, conseqüentemente, maior a dificuldade da bactéria em se desenvolver (Ostrosky et al., 2008).

Tanto o extrato metanólico bruto da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora), quanto as frações provenientes do fracionamento desse extrato (FA, G2, G2A, A2 e B1) foram testados frente a inibição do crescimento das seguintes cepas de *Staphylococcus*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

5.4.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A primeira cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa-padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Na Figura 19 é mostrado em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO), no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina), em que se observa que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado a atividade do extrato bruto metanólico (ECM) da abóbora onde se pode notar que houve um significativo crescimento bacteriano porém, menor que o crescimento visto no controle negativo, ou seja, já no extrato bruto ocorreu uma certa inibição do crescimento de *S. aureus*. E por fim para a fração FA, nota-se que o crescimento das bactérias é nitidamente menor, quando comparado ao extrato bruto. Sendo assim, verifica-se que do extrato bruto para a fração FA o crescimento das bactérias *S. aureus* foi inibido parcialmente, o que mostra que o fracionamento foi efetivo.

Com isso é concluído que a fração FA possui uma boa atividade antibacteriana já que consegue atingir a CMI, já o extrato bruto (ECM), apesar de inibir algumas colônias de bactérias, a quantidade de UFCs formadas é maior que trezentos, ou seja, não se atingiu a CMI.

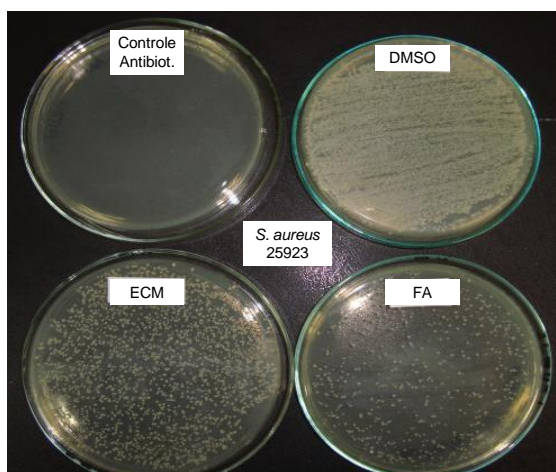


Figura 21: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Seguindo a ordem de fracionamento do extrato bruto, a próxima fração avaliada foi a fração G2. Conforme mostra a Figura 22, novamente são identificados, no sentido anti-horário, o controle negativo, o controle positivo, o extrato bruto e a fração G2. Os resultados obtidos para o controle negativo, controle positivo e extrato bruto foram discutidos anteriormente. Com isso, analisando a fração G2 observa-se que essa fração foi mais eficaz na inibição do crescimento bacteriano que o extrato bruto e que a fração FA (Figura 21). Porém, algumas UFC ainda são perceptíveis nessa fração, ficando essas UFCs dentro da faixa da CMI (entre 30 e 300) fazendo com que, G2 apresente uma significativa atividade antimicrobiana.

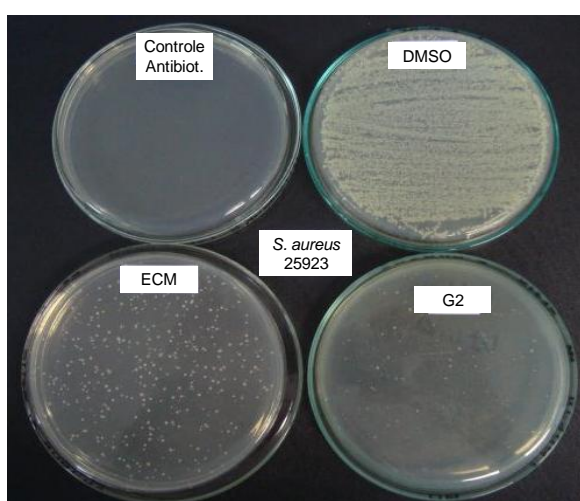


Figura 22: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A próxima fração a ser avaliada foi G2A (Figura 23), se observa que essa fração foi capaz de inibir totalmente o crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* usado nesse experimento já que não são visíveis UFC nessa fração. O resultado dessa fração é igual ao do controle positivo utilizado (antibiótico gentamicina) indicando que a fração G2A possui uma excelente atividade antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Nota-se também que, até o presente momento, à medida que o extrato bruto foi sendo fracionado, um aumento na atividade antibacteriana das frações foi sendo verificado, ou seja, até o presente momento, quanto maior a purificação das amostras, maior foi a inibição do crescimento bacteriano.

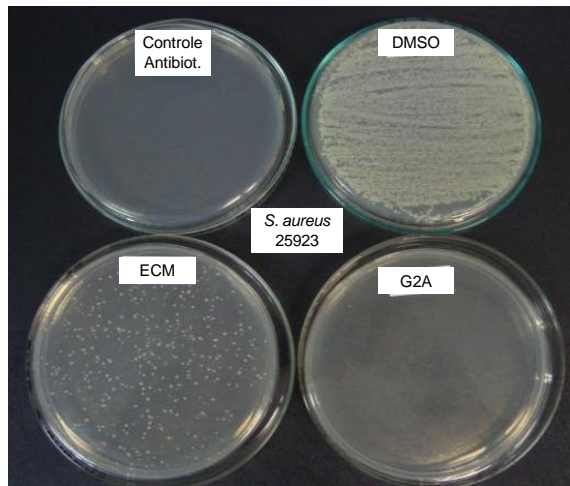


Figura 23: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Na fração A2, ao contrário do que estava ocorrendo até agora, o crescimento bacteriano foi observado (Figura 24). É nítida a presença de várias UFCs nessa fração, embora, quando comparado ao controle negativo (DMSO), ainda assim observa-se que houve uma inibição de crescimento bacteriano. Com isso a fração A2 também pode ser considerada como uma boa inibidora de cepas de *Staphylococcus* já que conseguiu atingir a CMI, de acordo com a quantidade de UFCs formadas. Todavia, se observa menos UFC para A2, quando comparado ao extrato bruto (ECM), como mostra a Figura 24.

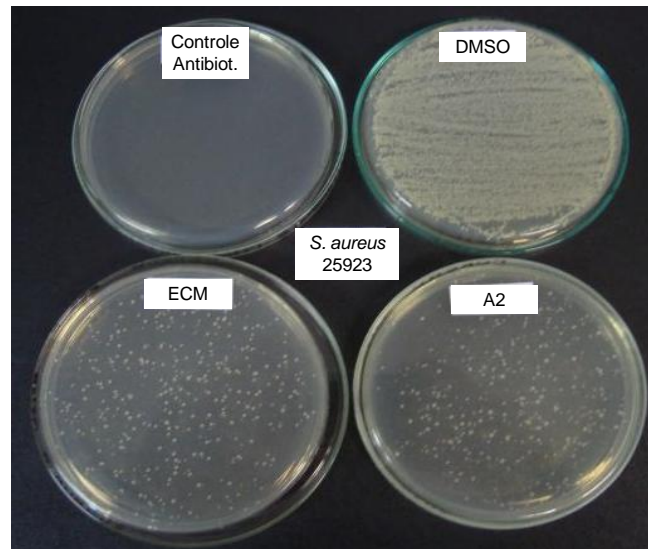


Figura 24: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A última avaliação foi feita com a fração B1 (Figura 25). Nessa fração o crescimento bacteriano é semelhante ao do controle negativo, onde não ocorreu inibição no crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* analisada. Com isso pode-se afirmar que a fração B1 não é eficaz na inibição da bactéria em questão. Ao comparar-se essa fração com a fração anterior (A2 - Figura 24) é notado que o crescimento bacteriano aumentou, ou seja, nesse caso, a purificação das amostras acarretou uma menor atividade antibacteriana. Os dados sugerem um sinergismo das substâncias constituintes destas frações, evidenciado pelo poder antibacteriano da fração G2, e possível antagonismo da fração B1.

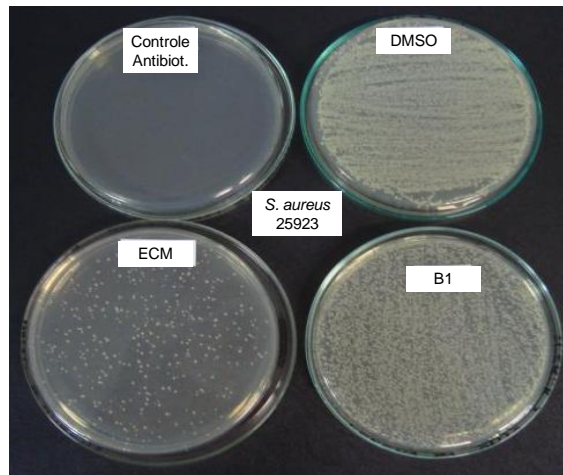


Figura 25: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Analisando todos os resultados em conjunto (Tabela 14) observou-se que no extrato bruto ocorreu uma inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Notou-se também que a purificação do extrato bruto foi eficaz como atividade antibacteriana até a fração G2A onde o crescimento bacteriano foi totalmente inibido, resultado esse semelhante ao do controle positivo. A partir dessa fração, à medida que a purificação das amostras foi ocorrendo, o crescimento bacteriano foi observado até chegar à fração B1, em que o crescimento bacteriano foi confluyente, resultado esse semelhante ao do controle negativo.

Tabela 14: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Amostras	A ¹	I ²	P ³
Extrato Bruto		X	
FA		X	
G2		X	
G2A	X		
A2		X	

B1			X
Controle Positivo	X		
Controle Negativo			X

¹A = UFC ≤ 1 (ausência de crescimento bacteriano)

²I = 30 ≤ UFC ≤ 300 (inibição de crescimento bacteriano)

³P = UFC ≥ 300 (presença de crescimento bacteriano)

5.4.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA)

A segunda cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 que é uma cepa resistente ao antibiótico meticilina. Na Figura 22 é mostrado, em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO) no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina) onde o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado a atividade do extrato bruto metanólico da abóbora onde pode-se notar que houve uma grande inibição no crescimento de bactérias alcançando a CMI, (apesar de se observar pouca quantidade de UFC, como está melhor representado na Figura 27). A fração FA, que também está representada na Figura 26, apresenta características bem parecidas com a do extrato bruto. Existe uma boa atividade antibacteriana para FA apesar de haver algumas UFC presentes (Figura 28). Com isso, tanto o extrato bruto quanto a fração FA de *Cucurbita moschata* possibilitaram uma boa interferência no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, apresentando quantidades de UFCs dentro da faixa de CMI.

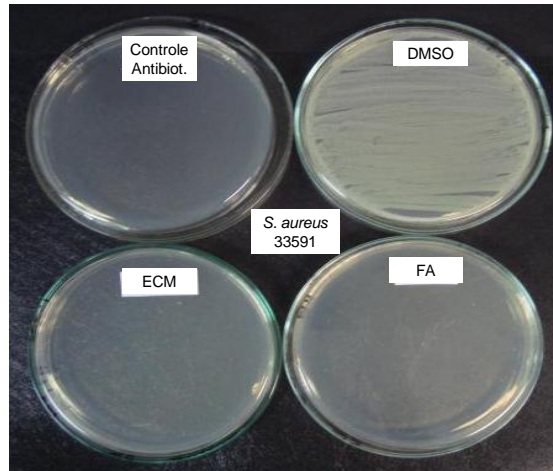


Figura 26: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

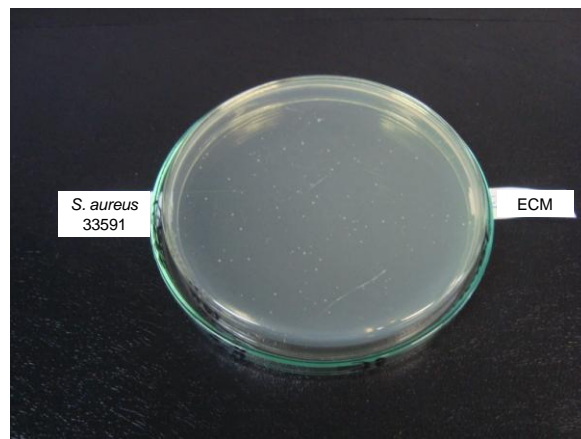


Figura 27: Atividade antibacteriana do extrato bruto de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

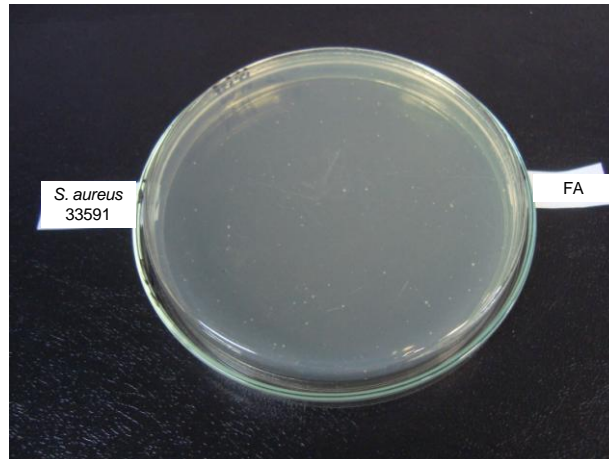


Figura 28: Atividade antibacteriana da fração FA de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

A próxima fração a ser analisada, seguindo a ordem de fracionamento do extrato bruto, foi a fração G2. Conforme mostra a Figura 29, novamente são identificados, no sentido anti-horário, o controle negativo, o controle positivo, o extrato bruto e a fração G2. Os resultados para o controle negativo, controle positivo e extrato bruto já foram discutidos anteriormente. Assim, analisando a fração G2 observa-se que a quantidade de colônias de bactérias que se desenvolveram foi bem maior que a do extrato bruto e da fração FA (Figura 26). No entanto, apesar de G2 ter apresentado um menor desempenho na inibição do crescimento bacteriano que o extrato bruto e FA, essa fração inibiu algumas colônias de bactérias, estando as UFCs dessa fração dentro da faixa de CMI, ou seja, essa fração possui atividade antibacteriana, mesmo que discreta.

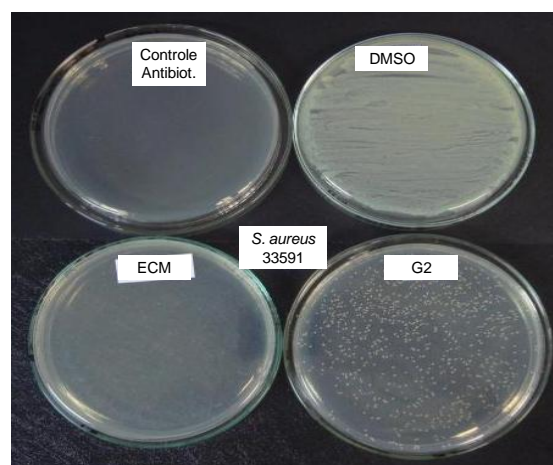


Figura 29: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina),

do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

A próxima fração a ser avaliada foi G2A (Figura 30), para esta placa observa-se que a fração G2A foi capaz de inibir totalmente o crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* usado nesse experimento já que não são visíveis UFC nessa fração. Os resultados obtidos para essa fração são iguais ao do controle positivo utilizado (antibiótico gentamicina), o que indica que a fração G2A possui uma excelente atividade antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. Essa fração está melhor visualizada na Figura 31.

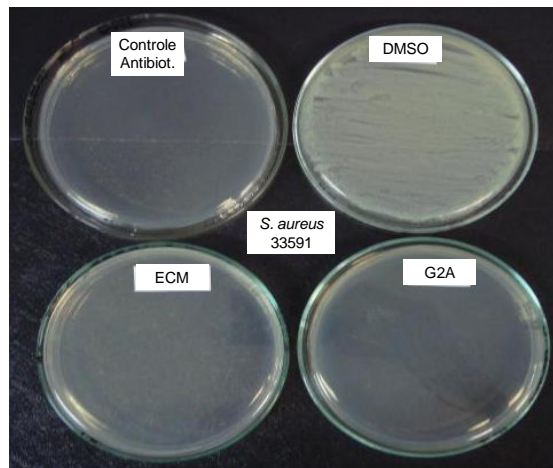


Figura 30: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

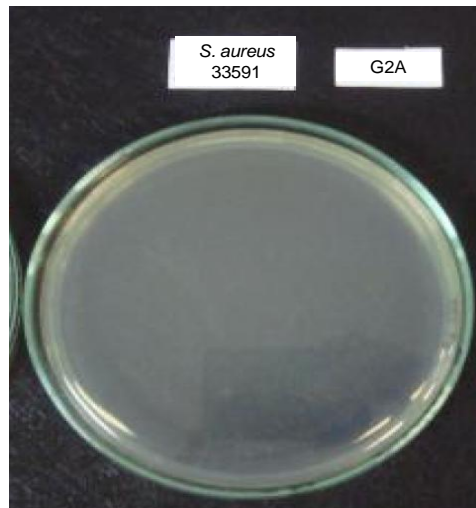


Figura 31: Atividade antibacteriana da fração G2A de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Se pode notar pela figura abaixo a seletividade desta fração pela cepa de *Staphylococcus* testada neste experimento, embora a fração que a originou (G2), não tenha apresentado resultados semelhantes.

Na fração seguinte A2, o crescimento bacteriano foi retornado (Figura 32). Em relação a fração anterior (G2A – Figura 31) houve um significativo crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, apesar de, quando contado suas UFCs, ainda assim observa-se que houve uma inibição de crescimento bacteriano, já que a fração A2 alcançou a CMI.

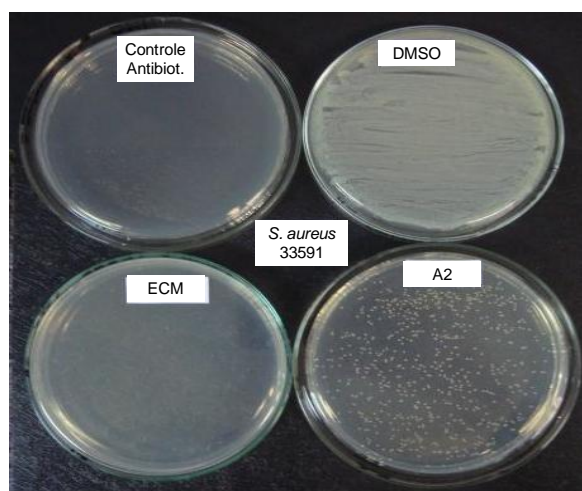


Figura 32: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

A última fração a ser analisada foi B1 (Figura 33). Nessa fração, o crescimento bacteriano é semelhante ao do controle negativo, não ocorreu inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas. Com isso pode-se afirmar que a fração B1 não é eficaz na inibição da bactéria em questão, por permitir o crescimento de mais de 300 UFCs. Ao comparar-se essa fração com a fração anterior (A2 - Figura 32) é notado que o crescimento bacteriano aumentou.

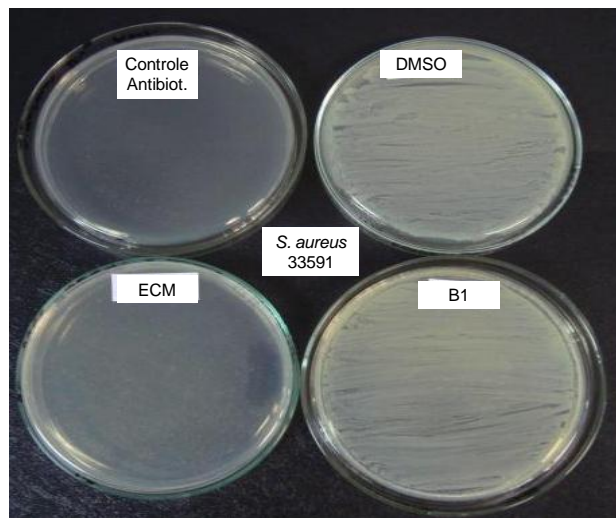


Figura 33: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Ao se analisar todos os resultados em conjunto (Tabela 15) pode-se observar que desde o extrato bruto já ocorreu uma inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591. Observou-se também que mesmo existindo um maior crescimento bacteriano na fração G2, logo em seguida, na fração seguinte (G2A) houve a total inibição das bactérias em estudo, resultado esse semelhante ao do controle positivo, o que faz essa fração apresentar uma excelente atividade antibacteriana. A partir dessa fração, à medida que a purificação das amostras foi ocorrendo, o crescimento bacteriano foi retomado, e para a fração B1, o crescimento bacteriano foi total, resultado esse semelhante ao do controle negativo.

Tabela 15: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 3351 (MRSA).

Amostras	A ¹	I ²	P ³
Extrato Bruto		X	
FA		X	
G2		X	
G2A	X		
A2		X	
B1			X
Controle Positivo	X		
Controle Negativo			X

¹A = UFC ≤ 1 (ausência de crescimento bacteriano)

²I = 30 ≤ UFC ≤ 300 (inibição de crescimento bacteriano)

³P = UFC ≥ 300 (presença de crescimento bacteriano)

5.4.3 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

A próxima cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Na Figura 34 está apresentada, em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO) no qual o crescimento bacteriano observado foi confluyente. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina) onde o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representada a atividade do extrato bruto metanólico da abóbora onde pode-se notar que houve uma expressiva inibição no crescimento de bactérias, apesar de mesmo assim terem se desenvolvido algumas UFCs, o que permite dizer que o extrato bruto alcançou a CMI. Em seguida está a fração FA que possui uma atividade antibacteriana menor que a do extrato bruto, já que nessa fração nota-se que existe uma maior quantidade de UFC que no extrato metanólico bruto.

Essa diferença sugere que no extrato bruto pode haver interação de sinergismo entre moléculas, quando comparada à fração FA, que contém menor interação devido o “grau de pureza” da mesma.

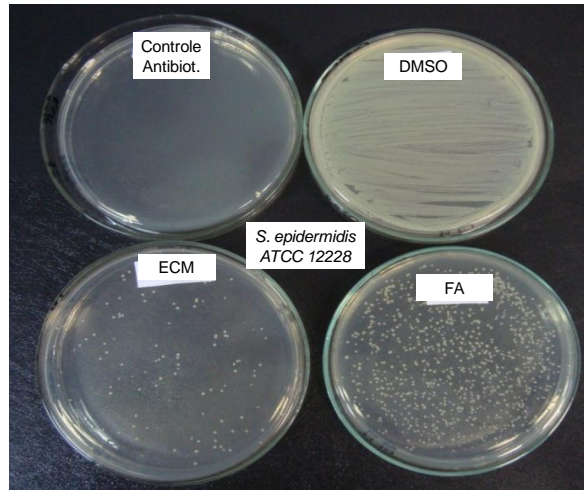


Figura 34: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Seguindo a ordem de fracionamento do extrato bruto, a próxima fração avaliada foi a fração G2. Conforme mostra a Figura 35, novamente são identificados, no sentido anti-horário, o controle negativo, o controle positivo, o extrato bruto e a fração G2, os resultados tanto dos controles quanto do extrato bruto já foram apresentados anteriormente. Logo, analisando a fração G2 observa-se que essa fração foi capaz de inibir totalmente o crescimento da cepa de *Staphylococcus epidermidis* usada nesse experimento já que não são visíveis UFC nessa fração. Os resultados obtidos para essa fração são iguais ao do controle positivo utilizado (antibiótico gentamicina), indicando desse jeito que a fração G2 possui uma excelente atividade antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

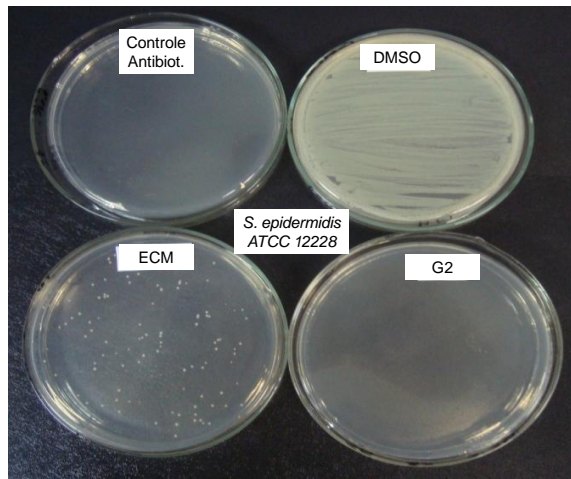


Figura 35: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Na próxima fração avaliada G2A, o crescimento bacteriano foi retornado (Figura 36). Há algumas unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nessa fração, no entanto, ainda assim há atividade antibacteriana por parte de G2A1, pois, essa fração possui a quantidade de bactérias desenvolvidas que se encontra dentro da faixa da CMI.

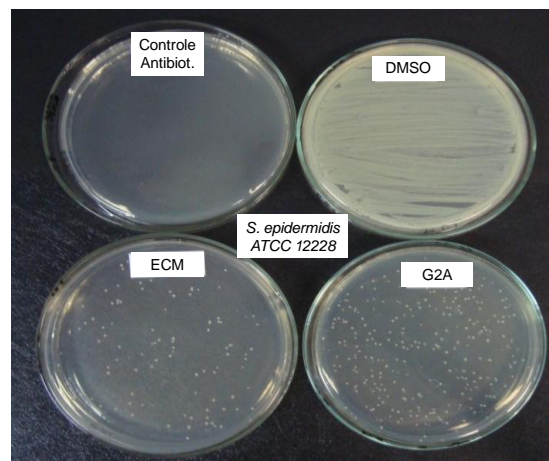


Figura 36: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Na fração A2 apresentada na Figura 37 também ocorre o crescimento bacteriano, sendo que, essa fração apresentou maior quantidade de UFC que a fração anterior (G2A – Figura 36), e menor quantidade de UFC que o controle negativo. Este motivo determina que mesmo possibilitando o crescimento de muitas colônias de bactérias, essa fração apresentou uma discreta atividade antibacteriana, porém o resultado para essa fração não atingiu a CMI necessária para determinar a boa atividade biológica.

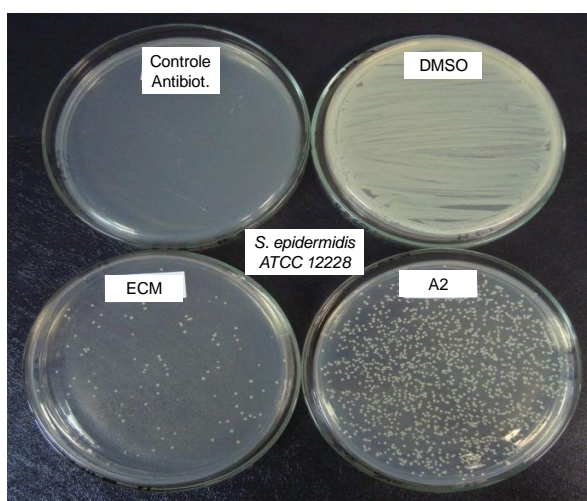


Figura 37: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Por fim, a última fração analisada foi B1 (Figura 38). Nessa fração o crescimento bacteriano é semelhante ao do controle negativo onde não ocorreu inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Com isso pode-se afirmar que a fração B1 não é eficaz na inibição da bactéria em questão. Ao comparar-se essa fração com as duas frações anteriores (G2A – Figura 36 e A2 – Figura 37) é notado que o crescimento bacteriano foi aumentando à medida que as amostras foram sendo fracionadas, com isso, para essas três frações, a purificação das amostras acarretou uma menor atividade antibacteriana.

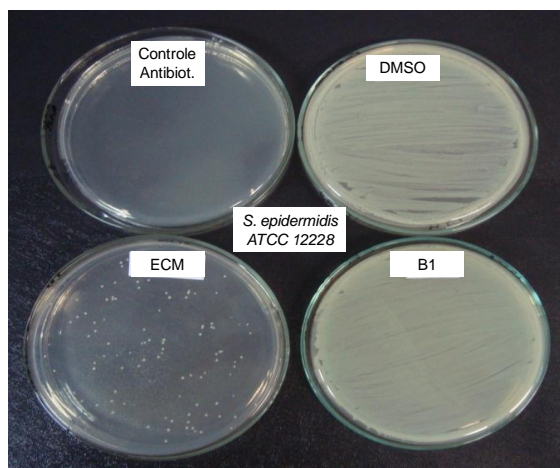


Figura 38: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Ao se agrupar todos os resultados e analisá-los (Tabela 16) observou-se que no extrato bruto de abóbora ocorreu uma inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Notou-se também que mesmo existindo um crescimento de bactérias na fração FA, na fração seguinte (G2) ocorreu a total inibição das cepas de *Staphylococcus*, resultado esse semelhante ao do controle positivo e que possibilita afirmar a ótima atividade antibacteriana presente em G2. A partir dessa fração, à medida que a purificação das amostras foi ocorrendo, o crescimento bacteriano foi retomado até chegar à fração B1, onde o crescimento bacteriano foi total, resultado esse semelhante ao do controle negativo, ou seja, não ocorreu nenhuma inibição por parte dessa fração.

Tabela 16: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Amostras	A ¹	I ²	P ³
Extrato Bruto		X	
FA		X	
G2	X		
G2A		X	

A2		X	
B1			X
Controle Positivo	X		
Controle Negativo			X

¹A = UFC ≤ 1 (ausência de crescimento bacteriano)

²I = 30 ≤ UFC ≤ 300 (inibição de crescimento bacteriano)

³P = UFC ≥ 300 (presença de crescimento bacteriano)

5.4.4 *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana

A última cepa bacteriana a ser analisada foi a cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana que foi isolada de um paciente em um hospital do município de Campos dos Goytacazes. Na Figura 39 é mostrado, em sentido anti-horário, a atividade do controle negativo (DMSO) no qual o crescimento bacteriano foi de 100%, preenchendo por inteiro a placa de Petri. Em seguida é ilustrado o controle positivo (antibiótico gentamicina), em que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido (não há UFC na placa de Petri). Logo abaixo está representado a atividade do extrato bruto metanólico da abóbora, e pode-se notar que houve inibição no crescimento de bactérias, apesar de se observar o desenvolvimento de algumas UFCs. Já na fração FA, que também está representada na Figura 39, nota-se que a inibição do crescimento de *Staphylococcus* foi mais evidente que no extrato bruto, indicando assim ter essa fração uma boa atividade antibacteriana já que atingiu a CMI. Com isso, a fração FA de *Cucurbita moschata* possibilitaram uma boa interferência no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

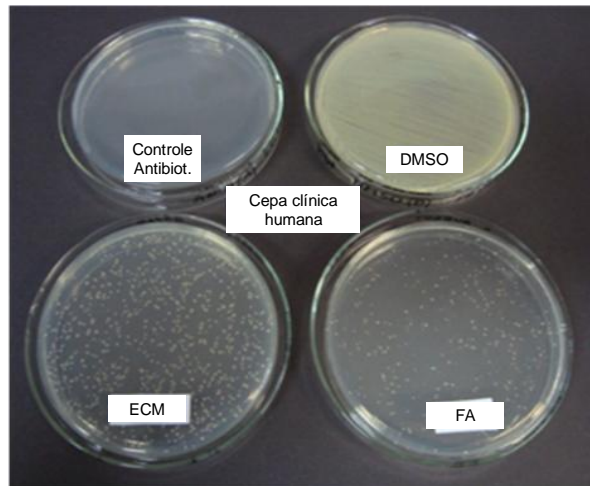


Figura 39: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração FA de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Seguindo a ordem de fracionamento do extrato bruto, a próxima fração avaliada foi a fração G2. Conforme mostra a Figura 40, novamente são identificados, no sentido anti-horário, o controle negativo, o controle positivo, o extrato bruto e a fração G2. Os resultados para o controle negativo, controle positivo e extrato bruto já foram discutidos anteriormente. Com isso, analisando a fração G2 observa-se que essa fração foi capaz de inibir totalmente o crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* usada nesse experimento, já que não são visíveis UFC nessa fração. O resultado dessa fração é igual ao do controle positivo utilizado (antibiótico gentamicina) indicando que a fração G2 possui uma excelente atividade antimicrobiana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana. Observa-se também que à medida que o extrato bruto foi sendo fracionado, um aumento da atividade antibacteriana das frações, ou seja, quanto maior a purificação das amostras, maior foi a inibição do crescimento bacteriano.

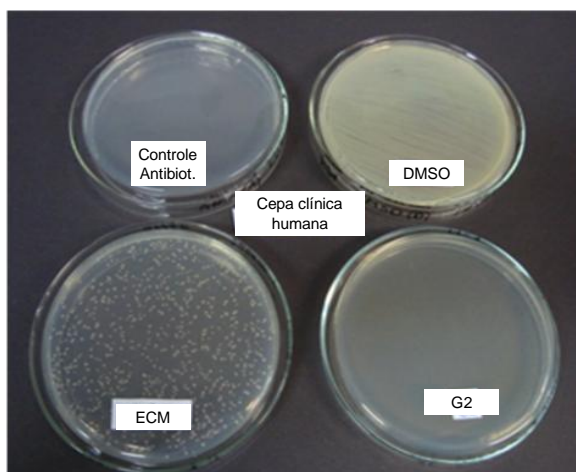


Figura 40: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Na fração G2A, ao contrário do que estava ocorrendo até agora, o crescimento bacteriano foi retornado (Figura 41). É nítida a presença de várias UFC nessa fração, estando ela bem semelhante ao extrato bruto. No entanto, quando comparado ao controle negativo (DMSO), ainda assim observa-se que houve uma inibição de crescimento bacteriano por parte de G2A, porém essa inibição não chegou a atingir a CMI necessária para se determinar a atividade antibacteriana por parte dessa fração.

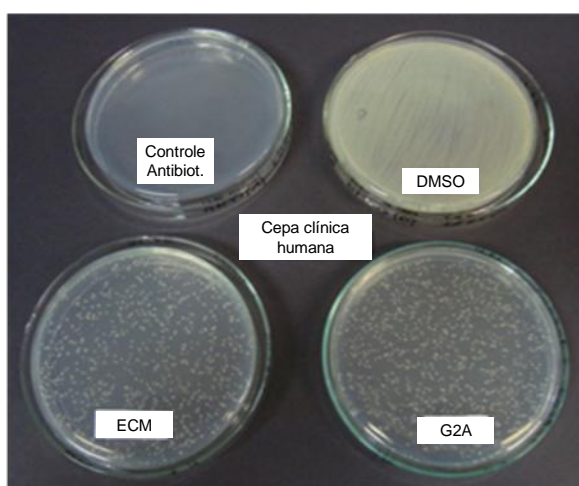


Figura 41: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração G2A de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Na fração A2 apresentada na Figura 42 também ocorre o crescimento bacteriano, sendo que, essa fração uma quantidade bem superior de UFC em relação à fração anterior (G2A – Figura 41) e menor quantidade de UFC que o controle negativo. Este fato determina que essa fração não foi eficaz na inibição do crescimento da bactéria em questão.

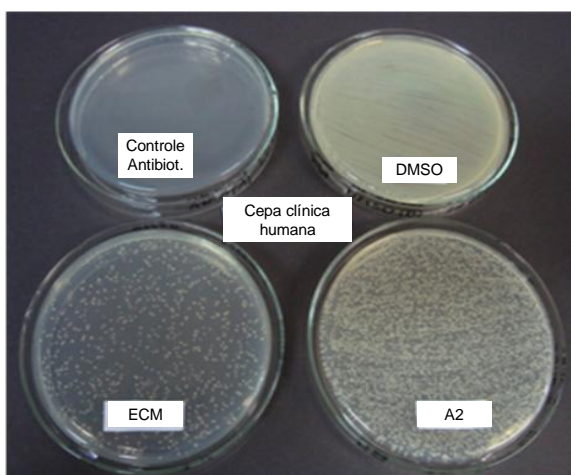


Figura 42: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração A2 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

A última avaliação foi feita com a fração B1 (Figura 43). Nessa fração o crescimento bacteriano é semelhante ao do controle negativo, em que não ocorreu inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas. Com isso pode-se afirmar que a fração B1 não é eficaz na inibição da bactéria em questão. Ao comparar-se essa fração com as duas frações anteriores (G2A – Figura 37 e A2 – Figura 42) é notado que o crescimento bacteriano aumentou, ou seja, nesse caso, a purificação das amostras acarretou uma menor atividade antibacteriana.

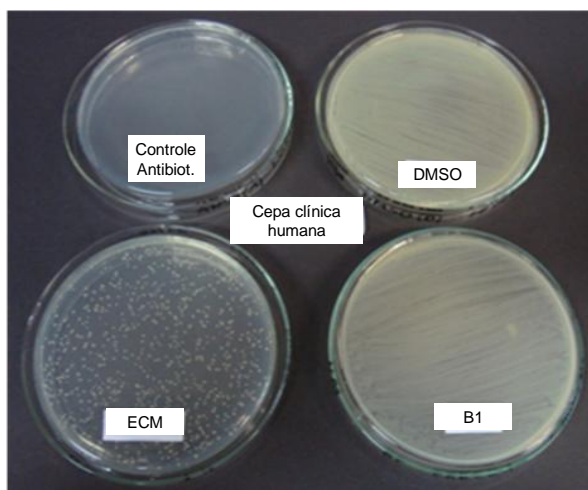


Figura 43: Atividade antibacteriana do controle positivo (antibiótico gentamicina), do controle negativo (DMSO), do extrato bruto e da fração B1 de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Analisando todos os resultados em conjunto (Tabela 17) observou-se que desde o extrato bruto ocorreu uma inibição no crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana. Notou-se também que a purificação do extrato bruto foi eficaz para a atividade antibacteriana até a fração G2, em que o crescimento bacteriano foi totalmente inibido, resultado esse semelhante ao do controle positivo.

Com isso, tem-se que para a bactéria em questão, a fração que apresentou a melhor atividade antibacteriana foi G2. A partir dessa fração, à medida que a purificação das amostras foi ocorrendo, o crescimento bacteriano foi retomado até chegar à fração B1, em que o crescimento bacteriano foi total, resultado esse semelhante ao do controle negativo, indicando que essa fração não possui atividade antibacteriana.

Tabela 17: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico bruto e frações da polpa de *Cucurbita moschata* (abóbora) frente à cepa *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana.

Amostras	A ¹	I ²	P ³
Extrato Bruto		X	
FA		X	

G2	X		
G2A		X	
A2		X	
B1			X
Controle Positivo	X		
Controle Negativo			X

¹A = UFC ≤ 1 (ausência de crescimento bacteriano)

²I = 30 ≤ UFC ≤ 300 (inibição de crescimento bacteriano)

³P = UFC ≥ 300 (presença de crescimento bacteriano)

Não há relatos na literatura sobre o uso de abóbora (*Cucurbita moschata*) na inibição de cepas de *Staphylococcus*. O que já foi estudado foi uma espécie da mesma família da abóbora (Cucurbitaceae) que foi utilizada para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Ramalhete et al., 2011). Ou ainda outras fontes vegetais que tiveram os seus extratos preparados com o mesmo solvente utilizado nesse trabalho (metanol) e, usando a mesma técnica de atividade antibacteriana (técnica de difusão em meio líquido) (Cruz-Galvez et al., 2013; Mayachiew e Devahastin, 2008). Tiveram trabalhos que além de usar extratos de fontes vegetais na inibição de micro-organismos, também compararam os resultados obtidos com a atividade antioxidante (Hussain et al., 2008; Silva et al., 2006). E por fim, foram verificados alguns trabalhos que usaram as mesmas cepas bacterianas utilizadas nessa Dissertação (Cruz-Galvez et al., 2013; Mayachiew e Devahastin, 2008; Hussain et al., 2008; Silva et al., 2006). Esses estudos são relatados mais detalhadamente no item 3.4.1 dessa Dissertação.

5.4.5 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente à diferentes cepas de *Staphylococcus*

De acordo com os resultados apresentados nos tópicos anteriores sobre a atividade antibacteriana, é possível relacionar quais amostras foram mais ou menos eficazes na inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus* usadas no presente trabalho (Tabela 18). Sendo assim, para a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a amostra que foi mais eficiente na inibição bacteriana foi G2A, enquanto que, a amostra menos eficiente foi B1. Já para a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, a amostra que mostrou melhores resultados na interferência de seu crescimento foi também a fração G2A, além de ficar para B1 o pior resultado. A terceira cepa bacteriana avaliada foi *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, em que ficou demonstrado que a amostra que mais inibiu o crescimento dessa bactéria foi a fração G2, ao passo que, a fração B1 foi a que menos conseguiu inibir o crescimento. Finalizando, foi testada a bactéria *Staphylococcus aureus* Cepa clínica humana na qual, também se obteve os melhores resultados de inibição bacteriana com a fração G2, e os piores resultados para B1.

Tabela 18: Avaliação da inibição do crescimento bacteriano frente à diferentes cepas de *Staphylococcus*.

Cepas bacterianas	Maior inibição	Menor inibição
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	G2A	B1
<i>S. aureus</i> ATCC 33591	G2A	B1
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	G2	B1
<i>S. aureus</i> Cepa clínica humana	G2	B1

Sendo assim, as amostras que demonstraram ter os melhores resultados na inibição do crescimento de diferentes cepas de *Staphylococcus* foram as frações G2A e G2.

5.5 Relação entre a parte química e a parte biológica

Paralelamente aos resultados obtidos frente às cepas de *Staphylococcus*, as frações G2 e G2A foram aquelas que apresentaram os melhores resultados de inibição bacteriana, e foi observado que para os ensaios de atividade antioxidante frente ao DPPH, G2 e G2A foram as frações que mostraram os melhores perfis como sequestradores de radicais livres, embora uma perda da atividade antioxidante tenha sido observada para G2 na menor concentração (10 µg/mL).

Os antioxidantes são altamente eficazes contra a oxidação de alimentos, e os estudos recentes mostram que uma importante maneira de se reduzir a oxidação através do sequestro de radicais livres em produtos alimentícios, é por meio de substâncias fitoquímicas presentes em compostos de origem vegetal, que seriam os antioxidantes naturais (Cesari et al., 2013; Li et al., 2012).

Além da oxidação desencadeada pelos radicais livres, a contaminação microbiana também é outra causadora de deterioração em alimentos durante o seu processamento e armazenamento. Além disso, esses micro-organismos podem também causar toxinfecções através de determinados tipos de alimentos (Cesari et al., 2013; Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012). O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva considerada uma das principais causadoras de toxinfecção alimentar no mundo inteiro (Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012).

Tanto a atividade antimicrobiana, quanto a atividade antioxidante observada nas frações G2 e G2A da abóbora (*Cucurbita moschata*) podem ser atribuídas à presença de compostos químicos. De acordo com os cromatogramas apresentados nesse trabalho, bem como os espectro de ultravioleta, supõem-se que podem estar presentes nessas frações substâncias tais como: ácidos carboxílicos, flavonóides, ácidos fenólicos ou aromáticos (Silverstein e Webster, 2001).

Mediante o exposto acima, a fração G2A foi aquela escolhida para uma discussão mais aprofundada, já que essa fração foi a que apresentou melhor atividade antioxidante, atividade essa superior a 90% nas três concentrações analisadas (Tabela 13), e também os melhores resultados na inibição do crescimento das cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 23) e ATCC 33591 (Figura 30), com um resultado semelhante ao controle positivo (100% de inibição). Essas cepas bacterianas são de suma importância já

que são referentes a principal bactéria (*Staphylococcus aureus*) relacionada à episódios de toxinfecções de origem alimentar, devido a sua facilidade em se desenvolver em alimentos (Santana et al., 2010; Cunha e Cunha, 2007; Kérouanton et al., 2007).

De acordo com o cromatograma da fração G2A (Figura 11) é nítida a presença de um pico majoritário no tempo de retenção de 3,302 minutos com uma área de 5.639.642 nm² (Tabela 10), e outros dois pico com menor intensidade no tempo de 9,434 e 16,903 minutos. Após os fracionamentos, o pico majoritário referente ao tempo de aproximadamente 3 minutos foi isolado na fração B1 conforme ilustra a Figura 13. Essa fração (B1), no entanto, apresentou atividade antioxidante somente na maior concentração analisada (79,9% de atividade – Tabela 13), e nenhuma inibição no crescimento bacteriano (Figura 25, Figura 33, Figura 38 e Figura 43).

Sendo assim, a boa atividade antioxidante e antibacteriana atribuída à fração G2A pode ser devido a um sinergismo entre o pico majoritário (3,302 minutos) e os outros dois picos presentes nessa fração (9,434 e 16,903 minutos).

Segundo o espectro de UV do pico majoritário (Figura 44), conclui-se que essa substância não pode ser atribuída nem à ácidos carboxílicos, nem à flavonóides visto que, os ácidos carboxílicos apresentam bandas características no comprimento de onda próximo a 220 nm (Zakavi e Gharab, 2007; Silverstein e Webster, 2001; Waksmundzka-Hajnos, 1998), enquanto, os flavonóides apresentam duas bandas de absorção características, a primeira no comprimento de onda entre 300-380 nm, e a segunda entre 240-280 nm (Alonso-Salces et al., 2004; Silverstein e Webster, 2001).

Com isso, dentre as possibilidades apontadas para uma possível substância referente ao pico majoritário da fração G2A, sobram apenas como opções, os compostos fenólicos, ou os ácidos aromáticos (Silverstein e Webster, 2001).

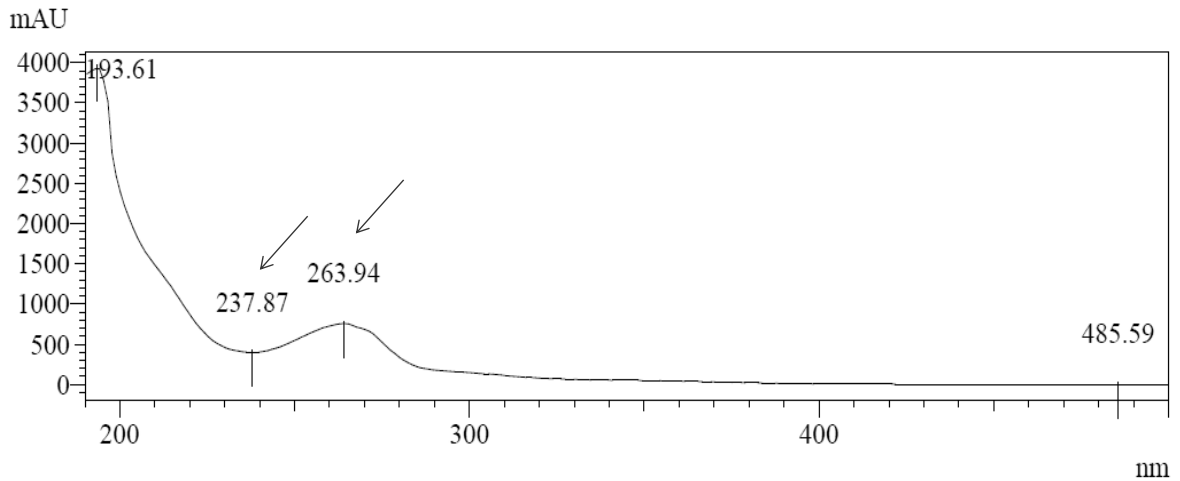


Figura 44: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 3,302 minutos, correspondente a fração G2A.

O UV referente aos picos do tempo de retenção de 9,434 e 16,903 minutos são mostrados na Figura 45 e Figura 46 respectivamente. De acordo com a Figura 45, referente ao pico de retenção do tempo de 9,434 minutos da fração G2A, são apresentadas um espectro de UV com bandas de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 240 e 300 nm.

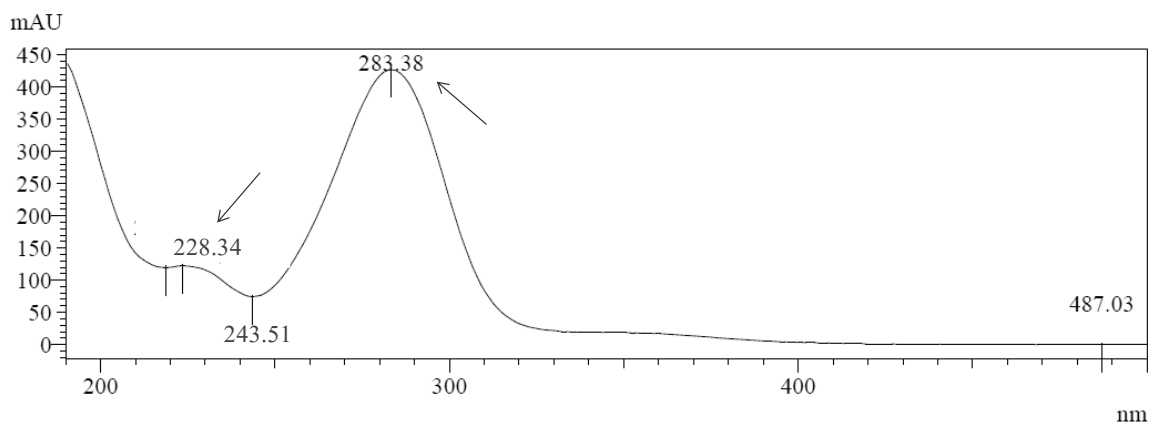


Figura 45: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 9,434 minutos, correspondente a fração G2A.

Já a Figura 46 apresenta o espectro de UV referente ao pico de retenção do tempo de 16,903 minutos da fração G2A. Nesse espectro são demonstradas duas bandas de absorção, a primeira no comprimento de onda de aproximadamente 240 nm e a segunda próxima de 300 nm.

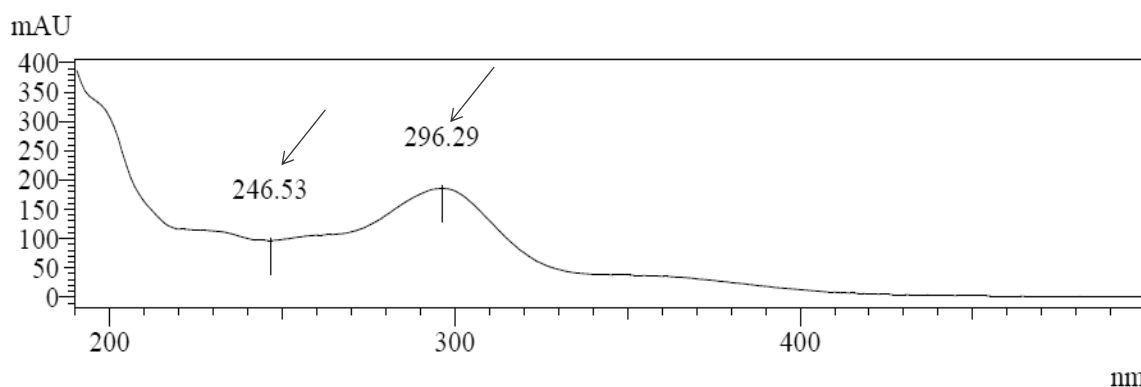


Figura 46: Espectro de UV do pico de tempo de retenção (TR) igual a 16,903 minutos, correspondente a fração G2A.

Segundo Alonso-Salces et al., 2004, as bandas de absorção entre 300 e 380 nm estão associadas à absorção do sistema cinamoil referente ao anel B de um flavonóide (banda I – Figura 47), enquanto que as bandas de absorção entre 240 e 280 nm são ocasionadas pela absorção do sistema benzoil do anel A do flavonoide (banda II – Figura 47).

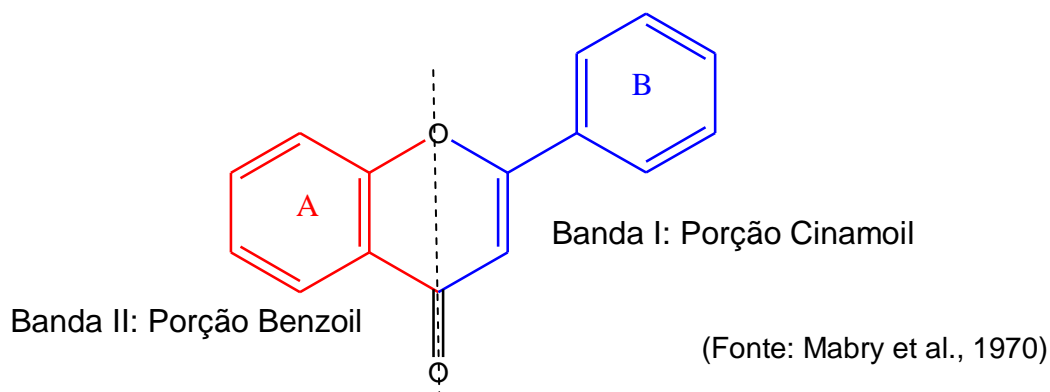


Figura 47: Esquema do flavonóide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

De acordo com o proposto acima, subentende-se que os picos no tempo de retenção de 9,434 e 16,903 minutos podem estar associados à flavonóides, já que apresentam espectros de UV com bandas de absorção em aproximadamente 240 e 300 nm (Figura 45 e Figura 46).

As bandas de absorção referente ao pico no tempo de retenção de 9,434 minutos (228 e 283 nm), estão abaixo do que é estabelecido para flavonóides (banda I – entre 300 e 380 nm, e banda II – entre 240 e 280 nm), porém se aceita que essa substância possa se tratar um flavonóide, já que pode ter ocorrido um

deslocamento hipsocrômico, isso é, quando um grupamento de átomos promove deslocamento da banda de absorção de uma molécula para regiões de menor comprimento de onda (Silverstein e Webster, 2001).

Para alguns desses compostos, já são conhecidas as propriedades da atividade antimicrobiana e antioxidante. Entre as moléculas que são consideradas ativas para atividade antimicrobiana e antioxidante, e que estão presentes em fontes vegetais, pode-se citar: terpenos, taninos, fenóis, flavonóides, ácidos fenólicos, entre outros (Cesari et al., 2013; Li et al., 2012; Tajkarimi et al., 2010; Kose et al., 2010).

Com base nestas observações, é de suma importância o descobrimento de substâncias químicas presentes em fontes vegetais que possam apresentar tanto atividades antioxidante quanto antimicrobiana. Assim, essas substâncias seriam uma excelente alternativa para o desenvolvimento de aditivos alimentares na indústria de alimentos, além do desenvolvimento de novos fármacos no campo da medicina.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram realizadas as análises para a quantificação dos teores de umidade, lipídios, proteínas e carboidratos da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*), verificou-se o perfil químico do seu extrato metanólico e das frações oriundas desse extrato, como também a medida da quantificação da atividade antioxidante, e a capacidade das amostras em inibir o crescimento de cepas bacterianas de espécies de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, o que em tese pode justificar seu uso popular um possível alimento funcional, e seu uso como antibacteriano principalmente em alimentos.

A polpa da abóbora foi avaliada quanto ao seu teor de umidade, lipídios, proteínas e carboidratos através de metodologias oficiais preconizadas na literatura. O teor de umidade foi de 85,4%, valor este bem próximo aos relatados na literatura. Os lipídios presentes na polpa de abóbora estudada mostraram valores inferiores (0,08%) aos demais valores quando comparados aos da literatura. Essa diferença pode ter sido ocasionada por alguma alteração de um ponto crítico durante a realização do experimento. O percentual de proteínas encontrado nesse trabalho foi de 0,9%, com isso o resultado obtido estava dentro da faixa dos valores encontrados na literatura. Por fim foi analisada a quantificação dos carboidratos que ficou em torno de 3,05%, valor este inferior aos valores relatados na literatura, porém, por ser semelhante ao valor descrito na tabela Taco, 2011 o resultado torna-se aceitável.

Para a obtenção do extrato, a polpa foi separada das cascas e das sementes, liofilizada e deixada em maceração estática com metanol a 10% p/v. Os fracionamentos cromatográficos foram utilizados com o intuito de se obter uma substância mais purificada e para o conhecimento do perfil químico.

O extrato bruto metanólico da polpa de abóbora quando avaliado por CLAE, apresentou um pico majoritário no tempo de retenção em torno de 3,499 minutos. A partir desse ponto iniciou-se o fracionamento do extrato bruto metanólico através de colunas cromatográficas abertas no intuito de se isolar a substância referente a esse pico majoritário. Após se realizar uma série de fracionamentos, de acordo com o perfil químico de cada fração analisada por CLAE e UV, apenas as frações ativas nos ensaios biológicos, e que apresentavam o pico de interesse até a fração denominada B1 (fração mais purificada). Como não havia massa suficiente dessa amostra, não foi possível realizar as técnicas necessárias que auxiliariam na elucidação estrutural dessa substância.

O extrato bruto metanólico, as frações e os padrões químicos quercetina, rutina, apigenina, ácido ascórbico e BHT foram avaliados quanto sua atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre estável DPPH em três concentrações distintas (1000, 100 e 10 µg/mL) . Em uma escala de capacidade de sequestro de radicais livres, a sequencia exata foi: FA = G2 = G2A > Extrato metanólico > A2 > B1. Merecem destaque as frações FA, G2 e G2A as quais os resultados indicaram atividade antioxidante em torno de 100% na maior concentração analisada.

O extrato metanólico bruto e as frações que apresentavam o pico de interesse em seu perfil químico (em torno de 3 minutos), foram avaliados quanto à atividade antibacteriana pelo método de diluição em meio líquido. Para determinar se houve ou não inibição no crescimento das cepas bacterianas foram utilizados um controle positivo (antibiótico gentamicina) e controle negativo (solvente DMSO). De acordo com os resultados encontrados é possível relacionar que as amostras que demonstraram ter os melhores resultados na inibição do crescimento de diferentes cepas de *Staphylococcus* foram as frações G2 e G2A com resultado semelhante ao controle positivo (100% de inibição).

Comparando os resultados da atividade antioxidante com a atividade antibacteriana, observa-se que são as mesmas frações que apresentaram os melhores resultados para essas duas atividades (frações G2 e G2A). Esse estudo indica então que há uma intenso sequestro de radicais livres e um bom potencial antibacterianos nas frações G2 e G2A proveniente da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Aziz, A.B., Abd El-Kalek, H.H. (2011) Antimicrobial proteins and oil seeds from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Nature and Science*. 9(3): 105-119.
- Abou-Khalil, R., Jraij, A., Magdalou, J., Ouaini, N., Tome, D., Greige-Gerges, H. (2009) Interaction of cucurbitacins with human serum albumin: Thermodynamic characteristics and influence on the binding of site specific ligands. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 95:189-195.
- Adams, G.G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Kok, M.S., Gray, D.A., Channell, G.A., Harding, S.E. (2012) Extraction, isolation and characterisation of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use. *Food Chemistry*.134:1919–1925.
- Adwan, G., Salameh, Y., Adwan, K. (2011) Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 456-460.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2012) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso: 03 de dezembro de 2012.
- Ahmad, R., Ali, A.M., Israf, D.A., Ismail, N.H., Shaari, K., Lajis, N.H. (2005) Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. *Life Science*. 76:1953-1964.
- Al-Bakri, A.G., Afifi, F.U. (2007) Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological*. 68:19-25.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008) Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 41(1):1-15.
- Alonso-Salces, R.M.; Barranco, A.; Abad, B.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. (2004) Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:2938-2952

- Alves, J.A., Vilas Boas, E.V.B., Vilas Boas, B.M., Souza, E.C. (2010) Qualidade de produto minimamente processado à base de abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 30:625-634.
- Amié, D.; Davidovié-Amié, D.; Beslo, D., Trinajstí, N. (2003) Structure-radical scavenging activity relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 76: 55-61.
- Annunziata, A., Vecchiob, R. (2013) Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Quality and Preference*. 28(1):348-355.
- Araújo, R., Rodrigues, A.G., Pina-Vaz, C. (2004) A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 53:783-786.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (1995) Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists. Arlington. 957 páginas.
- Badifu, G.I.O. (2001) Effect of processing on proximate composition, antinutritional and toxic contents of kernels from Cucurbitaceae species grown in Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14:153-161.
- Baggio, S.R., Bragagnolo, N. (2004) Validação da metodologia para determinação simultânea, por CLAE, de colesterol e óxidos de colesterol em produtos cárneos processados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 24:64-70.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99:191-203.
- Barna, B., Fodor, J., Harrach, B.D., Pogány, M., Király, Z. (2012) The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*. 59:37-43.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29:113-126.
- Behling, E.B., Sendão, M.C., Francescato, H.D.C., Antunes, L.M.G., Bianchi, M.L.P. (2004) Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutri.* 15(3): 285-292.
- Bernardes, N.R., Pessanha, F.F., Oliveira, D.B. (2010) Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. *Revista Ciência e Cultura*. 6:11-19.
- Bhatla, S.C., Kaushik, V., Yadav, M.K. (2010) Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 28:293-300.
- Bisognin, D.A (2002) Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*. 32(5):715-723.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3):223-253.
- Caili, F., Huan, S., Quanhong, L. (2006) A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*. 61: 73-80.
- Carlos, L.A., Amaral, K.A.S., Vieira, I.J.C., Mathias, L., Braz-Filho, R., Samarão, S.S., Vieira-da-Motta, O. (2010) *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with

staphylococcal density, enterotoxin production and antimicrobial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41:612-620.

Carrilloa, E., Prado-Gascób, V., Fiszmana, S., Varelaa, P. (2013) Why buying functional foods? Understanding spending behaviour through structural equation modeling. *Food Research International*. 50:361–368.

Carvalho, M.L.M., Silva, C.D., Oliveira, L.M., Silva, D.G., Caldeira, C.M. (2009) Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. *Revista Brasileira de Sementes*. 31:221-227.

Cassettari, V.C., Strabelli, T., Medeiros, E.A.S. (2005) *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9(1):70-76.

Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:402-405.

Castro-Rosas, J., Escartín, E.F. (1999) Incidence and germicide sensitivity of *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae* O1 in alfalfa sprouts. *Journal of Food Safety*. 19:137-146.

Cavalcanti, S.M.M., França, E.R., Cabral, C., Vilela, M.A., Montenegro, F., Menezes, D., Medeiros, C.R. (2005) Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 9(1):56-63.

Cecílio, A.B., Faria, D.B., Oliveira, P.C., Caldas, S., Oliveira, D.A., Sobral, M.E.G., Duarte, M.G.R., Moreira, C.P.S., Silva, C.G., Almeida, V.L. (2012) Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*. 141(3):975-981.

Cesari, I., Hoerle, M., Simoes-Pires, C., Queiroz, E.F., Dacarro, C., Marcourt, L., Moundipa, P.F., Carrupt, P.A., Cuendet, M., Caccialanza, G., Wolfender, J.L., Brusotti, G. (2013) Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gurke) extracts and its main constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. 146:264-270.

Clancy, D.; Birdsall, J. (2012) Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Ageing Research Reviews*.

Copland, A., Nahar, L., Tomlinson, C.T.M., Hamilton, V., Middleton, M., Kumarasamy, Y., Sarker, S.D. (2003) Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*. *Fitoterapia*. 74:133-135.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G., M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., Lima, E.O. (2010) Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 33:467-471.

Cruz-Galvez, A.M., Aldapa-Gómez, A., Villagómez-Ibarra, J.R., Chavarría-Hernández, N., Rodrigues-Baños, J. (2013) Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*. 32:289-295.

- Cuyckens, F., Claeys, M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*.39:1-15.
- Cunha, A.S., Cunha, M.R. (2007) Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. *Saúde & Ambiente em Revista*. 2(1):105-114.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 26(2):446-452.
- Endef, Estudo Nacional da Despesa Familiar (1999). Tabelas de Composição de Alimentos. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE - Rio de Janeiro, 5ª ed.
- Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Barberán-Tomás, F.A. (2007) Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 68:2986-3008.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. (2011) Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Falguera, V., Aliguerb, N., Falguera, M. (2012) An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*. 26(2):274-281.
- Fiorucci, A.R., Soares, M.H.F.B., Cavalheiro, T.G. (2003) A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. *Química Nova na Escola*. 17:03-07.
- Feltrin Sementes. Disponível em: <<http://www.chicoria.com.br/produtos-detalle-abobora-ningo-jacarezinho-casca-grossa>> Acesso: 12 de dezembro de 2012.
- Ganinia, D., Canistrob, D., Janga, J., Stadlerc, K., Masona, R.P., Kadiiskaa, M.B. (2012) Ceruloplasmin (ferroxidase) oxidizes hydroxylamine probes: Deceptive implications for free radical detection. *Free Radical Biology and Medicine*. 53(7):1512-1521.
- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*. 113:236-247.
- Glew, R.H., Glew, R.S., Chuang, L.T., Huang, Y.S., Millson, M., Constans, D., Vanderjagt, D.J. (2006) Amino acid, mineral and fatty acid content of pumpkin seeds (*Cucurbita spp*) and *Cyperus esculentus* nuts in the republic of Niger. *Plant Foods for Human Nutrition*. 61:51-56.
- Gondim, J.A.M., Moura, M.F.V., Dantas, A.C., Medeiros, R.L.S., Santos, K.M. (2005) Composição centesimal de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25:825-827.
- González, E., Montenegro, M.A, Nazareno, M.A, López, B.A.M. (2001) Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51(4):395-399.
- Grecco, E.D., Silveira, L.F.V., Lima, V.L.S., Pezzopane, J.E.M. (2011) Estimativa do índice de área foliar e determinação do coeficiente de extinção luminosa da abóbora *Cucurbita moschata* var. japonesa. *Idesia*. 29:37-41.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., Castro, C., Arriaga, D., García-Armesto, M.R., Valle, P. (2012) Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 26:555-563.

- Halliwell, B. (2011) Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*. 32:125-130.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86:985-990.
- Hammond, B.G., Jez, J.M. (2011) Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. *Food and Chemical Toxicology*. 49:711-721.
- Hancock, R.D., Chudek, J.A., Walker, P.G., Pont, S.D.A., Viola, R. (2008) Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae. *Phytochemistry*. 69:1850-1858.
- Heim, K. E. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*. 13:572-584.
- Huang, D.; Boxin, O., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856.
- Huang, X.E., Hirose, K., Wakai, K., Matsuo, K., Ito, H., Xiang, J., Takezaki, T., Tajima, K. (2004). Comparison of lifestyle risk factors by family history for gastric, breast, lung and colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 5:419-427.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R. (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108:986-995.
- Instituto Adolfo Lutz - IAL. (2005) Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ªed. Brasília: Ministério da Saúde. 1018 páginas.
- Jacob-Valenzuela, N., Maróstica, M.R.J., Zazueta, J.J.M., Gallegos, J.A.I. (2011) Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata*, *Duchense* vs. *Cehualca*. *Food Research International*. 44:2587–2593.
- Jian, L., Du, C.J., Lee, A.H., Binns, C.W. (2005) Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer? *Int. J. Cancer*. 113:1010-1014.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., Buyser, M.L. (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115:369–375
- Khan, M.I., Arshad, M.S., Anjum, F.M., Sameen, A., Aneeq-ur-Rehman, Gill, W.T. (2011) Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International*. 1:1-9.
- Koike, K., Li, W., Liu, L. (2005) New phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *Chem Pharm Bull*. 53:225-228.
- Koleva, L. I., Van Beek, T .A., Linszen, J. P. H., De Groot, A., Evstatieva, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*. 13:8-17.
- Kose, E.O., Deniz, I.G., Sankürkcü, C., Aktas, O., Yavuz, M. (2010) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (*var. erythrantha* and *var. cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 48:2960-2965.

- Kostálová, Z., Hromádková, Z., Ebringerová, A., Polovkova, M., Michaelson, T.E., Paulsen, B.S. (2013) Polysaccharides from the Styrian oil-pumpkin with antioxidant and complement-fixing activity. *Industrial Crops and Products*. 41:127–133.
- Krystallisa, A., Maglaras, G., Mamalisc, S. (2008) Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. *Food Quality and Preference*. 19(6):525–538.
- Lemos, G.C.S (1997) Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de espécies vegetais frente a bactérias de mastite bovina. Dissertação (Mestrado em 1997) – Campos dos Goytacazes – RJ – UENF, 141p.
- Li, W.J., Nie, S.P., Liu, X.Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.Y (2012). Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. *Food and Chemical Toxicology*. 50:689-694.
- Lima Júnior, D.M., Monteiro, P.B.S., Rangel, A.H.N., Oliveira, S.E.O., Maciel, M.V. (2011) Alimentos funcionais de origem animal. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 6:10-20.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J. (2011) The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*. 126:261-269.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas. M.B. (1970) The systematic identification of flavonoids. Nova York: Springer-Verlag.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr., V.F. (2002) Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 25:429-438.
- Manhães, L.R.T. (2007) Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia Flexuosa*, Mart.): um potente alimento funcional. Dissertação de Mestrado – Seropédica – RJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 78 páginas.
- Mariod, A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, M., Ismail, N. (2010) Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*. 118(1):120-127.
- Mayachiew, P.; Devahastin, S. (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT*. 41:1153-1159.
- Montanari, C.A., Bolzani, V.S. (2001) Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. 24:105-111.
- Moreira, T.M.S., Salgado, H.R.N., Pietro, R.C.L.R. (2010) O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20:435-440.
- Moreno-Enriquez, R.I., Garcia-Galaz, A., Acedo-Felix, E., Gonzalez-Rios, I.H., Call, J.E., Luchansky, J.B. (2007) Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail Queso fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection*. 70:2596-2601.
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. (2011) Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 129:139-148.
- Murkovic, M., Mülleder, U., Neunteufl, H. (2002) Carotenoid Content in Different Varieties of Pumpkins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15:633-638.

- Ng, K.L., Ciou, J.S., Huang, C.H. (2010) Prediction of protein functions based on function–function correlation relations. *Computers in Biology and Medicine*. 40:300-305.
- Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Park, J.W., Kim, S.K. (2010) In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*. 2:107-117.
- Nissen, N., Evans, S. (2012) Exploring the practice and use of Western herbal medicine: Perspectives from the social science literature. *Journal of Herbal Medicine*. 2:6 -15.
- Niva, M. (2007) All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*. 48(3):384-393.
- Ojeda-Sanaa, A.M., Barenb, C.M., Elechosac, M.A., Juárezc, M.A., Morenoa, S. (2013) New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 31:189-195.
- Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Goulart, M.O.F. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quimica Nova*. 32:(3)689-702.
- Oliveira, D.B. (2005) Aspectos Químicos e Etnomedicinais de Plantas da Dieta de Cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural – SESC Pantanal. Tese de Doutorado – Rio de Janeiro – RJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 206 páginas.
- Oloyede, F.M., Agbaje, G.O., Obuotor, E.M., Obisesan, I.O. (2012) Nutritional and antioxidant profiles of pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) immature and mature fruits as influenced by NPK fertilizer. *Food Chemistry*. 135(2):460-463.
- Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., Freitas, B.R. (2008) Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2):301-307.
- Papadaki, A., Valsta, L.M., Lampi, A.M., Peñalvo, J., Adlercreutz, H., Vardavas, C., Kafatos, A. (2011) Differences in nutrient intake during a Greek Orthodox Christian fasting and non-fasting week, as assessed by a food composition database and chemical analyses of 7-day weighed food samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:22-28.
- Park, S.C, Kim, J.Y., Lee, J.K., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.W., Hahm, K.S., Park, Y. (2009) Antifungal mechanism of a novel antifungal protein from pumpkin rinds against various fungal pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:9299-9304.
- Patiño, J.L.A., Balderas, E.J., Oropeza, M.A.J., Zagoya, J.C.D. (2001) Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology*. 77:99-101.
- Peschel, W., Rabaneda, F.S., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Raventós, R.L., Buxaderas, S., Codina, C. (2006) An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*. 97:137-150.
- Pinheiro D.M., Porto, K.R.A., Menezes, M.E.S. (2005) A Química dos Alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. 1ª edição, Maceió: UFAL.
- Polakowska, K., Lis, M.W., Helbina, W.M., Dubind, G., Dubind, A., Niedziolkab, J.W., Miedzobrodzka, J., Wladykad, B. (2012) The virulence of *Staphylococcus aureus* correlates with strain genotype in a chicken embryo model but not a nematode model. *Microbes and Infection*. 14(14):1352-1362.

- Radovanovic, A., Rdovanovic, B., Jovancicevic, B. (2009) Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*. 117:326-331.
- Rahman, A., Kang, S.C. (2009) In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*. 116:670-675.
- Ramalhete, C., Spengler, G., Martins, A., Martins, M., Viveiros, M., Mulhovo, S., Ferreira, M.J.U., Amaral, L. (2011) Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37:70-74.
- Ramalho, V.C., Jorge, N. (2006) Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29:755-760.
- Ravishankar, K., Kiranmayi, G.V.N., Appa Reddy, G.V., Sowjanya, V.V.L., Sainadh, V.B., Durga, V.G.L., Prasad, V.S., Swaminaidu, P.V., Prasad, T. (2012) Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2:86-91.
- Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., Hamdi, S. (2012) Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*. 37:82–87.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20:933-956.
- Rios, A.O., Antunes, L.M.G., Bianchi, M.L.P. (2009) Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. *Food Chemistry*. 113:1113-1118.
- Rios, J.L., Escandell, J.M., Recio, M.C. (2004) New insights into the bio activity of cucurbitacins. *The Netherlands: Elsevier*. 429-469.
- Robbins, R.J. (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 51:2866-2887.
- Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Souza, C. A. S., Pastore, G. M. (2007) Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:53-60.
- Ross, J.A., Kasum, C.M. (2002) Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*. 22:19–34.
- Sabudak, T.; Dokmech, D.; Ozygit, F.; Isik, E.; Aydogdu, N. (2005) Antiinflammatory and Antioxidant Activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* Extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 20:1491-1496.
- Sayago, F.J., Jiménez, A.I., Cativiela, C. (2007) Efficient access to N-protected derivatives of (R,R,R)- and (S,S,S)-octahydroindole-2-carboxylic acid by HPLC resolution. *Tetrahedron: Asymmetry*. 18:2358-2364.
- Santana, E.H.W., Beloti, V., Aragon-alegro, L.C., Mendonça, M.B.O.C. (2010) Estafilococos em Alimentos. *Arq. Inst. Biol.* 77(3): 545-554.
- Santos, A.L., Santos, D.O., Freitas, C.C., Ferreira, B.L.A., Afonso, I.F., Rodrigues, C.R., Castro, H.C. (2007) *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Journal Bras Patol Med Lab*. 43(6): 413-423.

Santos, F.J.B., Moura, D.J., Péres, V.F., Sperotto, A.R.M., Caramão, E.B., Cavalcante, A.A.C.M., Saffi, J. (2012) Genotoxic and mutagenic properties of Bauhinia platypetala extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 144(3):474-482.

Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R., Vidal, F.L.N. (2006) Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 99:431-435.

Silverstein, R.M., Webster, F.X. (2001) Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª edição, LTC. Rio de Janeiro, RJ.

Singh, S.S., Sharma, K., Barot, D., Mohan, P.R., Lohray, V.B. (2005) Estimation of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in Wistar rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 821:173-180.

Skoog, D. A., Hpller, F. J., Nieman, T. A. (2002) Princípios da Análise Instrumental. 5 edição, Porto Alegre: Bookman.

Sousa, F.C.F., Melo, C.T.V., Citó, M.C.O., Félix, F.H.C., Vasconcelos, S.M.M., Fonteles, M.M.F., Filho, J.M.B., Viana, G.S.B. (2008) Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18:642-654.

Taco (2011) Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos. Campinas - SP: NEPA-UNICAMP, 4ª edição.

Tajkarimi, M.M.; Ibrahim, S.A.; Cliver, D.O. (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21:1199-1218.

Tbca-Usp (2008) Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP.

Torres, E.A.F.S., Campos, N.C., Duarte, M., Garbelotti, M.L., Philippi, S.T., Minazzi-Rodrigues, R.S. (2000) Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 20.

Urala, N., Lähteenmäki, L. (2004) Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. *Food Quality and Preference* 15:793-803.

Usda (2001) Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: <<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=2809>>.

Vaquero, M.J.R., Serravalle, L.R.T., Nadraa, M.C.M., Saada, A.M.S. (2010) Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*. 21(5):779-785.

Vo, T.S., Kima, S.K. (2012) Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. *Journal of Functional Foods*. 89:173-191.

Vuong, C., Götz, F., Otto, M. (2000) Construction and characterization of an agr deletion mutant of *staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. 68(3):1048-1053.

Waksmundzka-Hajnos, M. (1998) Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *Journal of Chromatography B*. 717:93-118.

Xanthopoulou, M.N., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S. (2009) Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Research International* 42:641-646.

Xia, T., Wang, Q. (2006) D-chiro-Inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58:1527-1532.

Yadav, M., Jain, S., Tomar, R., Prasad, G.B.K.S., Yadav, H. (2010) Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review. *Nutrition Research Reviews*. 23:184-190.

Yang, H., Ge, Y., Sun, Y., Liu, D., Ye, X., Wu, D. (2011) Identification and characterisation of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. *Food Chemistry*. 128:1128-1135.

Zakavi, S.; Gharab, N.G. (2007) Interaction of para-substituted meso-tetraphenylporphyrins and meso-tetra(n-propyl)porphyrin with weak and strong carboxylic acids: A UV-Vis spectroscopic study. *Polyhedron*. 26:2425-2432.

Zhang, H. (2003). Determination of γ -amino-butyric acid and amino acids in pumpkin. *Food Res Dev*. 24(3):108-109.