

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO  
ÁREA DE METABOLISMO E DIETÉTICA**

**Avaliação da composição química da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) e  
do efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo hepático  
de ratos (*Rattus norvegicus*)**

**LINA CLÁUDIA SANT'ANNA**

**Orientação  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Patrícia Faria Di Pietro**

**Florianópolis (SC), dezembro de 2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO  
ÁREA DE METABOLISMO E DIETÉTICA**

**Avaliação da composição química da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) e  
do efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo hepático  
de ratos (*Rattus norvegicus*)**

**LINA CLÁUDIA SANT'ANNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito final para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

**Orientação:  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Faria Di Pietro**

**Florianópolis (SC), dezembro de 2005**

LINA CLÁUDIA SANT'ANNA

**Avaliação da composição química da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) e do efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo hepático de ratos (*Rattus norvegicus*)**

**Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Nutrição, área de Metabolismo e Dietética pela Comissão formada por:**

Presidente:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Faria Di Pietro

Membro:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte

Membro:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriane Belló Klein

Membro:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Waslawik

Florianópolis (SC), dezembro de 2005.

*Aos meus pais, por mais uma vez terem me proporcionado o apoio e a confiança necessários para seguir adiante. Foi por eles que hoje cheguei até aqui!*

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Patrícia Faria Di Pietro pelo seu carinho e amizade, pelos momentos que me acolheu, incentivou e orientou, por ter acreditado em mim;

À professora Vera Lúcia Tramonte por ter me aceitado como “filha adotiva” e ter me apoiado em todo o percurso;

À professora Adriane Belló Klein por ter aceitado participar da banca de defesa e por toda a ajuda oferecida na qualificação e no decorrer deste trabalho;

À professora Elizabeth Waslawik por ter aceitado participar da banca de defesa deste trabalho e por todas as vezes que emprestou seu laboratório para realizarmos nossas análises;

Ao professor Danilo Wilhelm Filho por todos os ensinamentos sobre oxidantes e antioxidantes;

À doutoranda Roberta Hack Mendes pela sua amizade e por ter vindo a Florianópolis, especialmente, para nos ajudar com a técnica de carbonila;

À professora Rozângela Curi Pedrosa e à bolsista Karina Bettega Felipe por terem nos ajudado com reagentes e solucionado dúvidas ao longo das análises;

À professora Edna Amante pela enorme ajuda com a análise de fibra nas rações;

Ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, por intermédio do Projeto Aproveitamento Integral dos Alimentos pela compra de reagentes para análise de composição centesimal;

Ao professor Daniel Barrera-Arellano pela determinação de ácidos graxos no óleo da semente de abóbora;

À professora Alcíbia e ao farmacêutico Rafael Prim por terem aceitado com muita prontidão a realização da análise de compostos organofosforados nos animais.

Aos meus colegas de mestrado em especial a Débora Guimarães, Débora Fernanda, Manuela, Jane, Bettina, Luciane, Renata, Elizabeth, Clarissa e Braian que estiveram comigo desde o início e que com certeza tornaram tudo mais agradável;

Ao técnico do laboratório de Nutrição Experimental, Gerson Faccin, por toda a sua paciência e boa vontade em colaborar com este e outros trabalhos;

Ao bioquímico e doutorando Giuliano Di Pietro que nos ajudou com as análises sendo sempre muito paciente com as nutricionistas;

Às professoras Anete Araújo e Rossana da Costa Proença por terem nos mostrado o caminho correto para a realização de uma boa pesquisa;

Aos sempre prestativos Nelson Delfino e Marinele Fernandes, secretários da Pós-Graduação, que me ajudaram em muitos momentos da maneira mais paciente e alegre possível, fazendo-me entender os processos burocráticos de um mestrado;

Às amigas Francilene Kunradi e Brunna Boaventura pelo apoio e colaboração em todas as etapas. Elas foram maravilhosas!

Às estudantes de Nutrição Amanda Fagundes, Maria Gabriela Villa Mayor e Maria Eduarda de Oliveira Nascimento, por todo o auxílio oferecido no ensaio biológico. A ajuda de vocês foi imprescindível;

À minha amiga e irmã Sandra Patrícia Crispim, mesmo de longe, me apóia e me ajuda como se estivesse ao meu lado;

Aos meus irmãos Luis Antônio e Ângela Cristina por serem tão especiais para mim;

Aos meus pais de coração Heitor, Neida e Isabel que acreditaram em mim desde o início e sempre me ajudaram em qualquer e todo momento que precisei, fazendo com que a minha vida em Florianópolis se tornasse mais fácil e divertida;

Ao meu noivo, Marcelo, por ser tudo na minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Estresse oxidativo .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Defesas antioxidantes .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1 Antioxidantes endógenos.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2 Antioxidantes exógenos .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2.1 Vitamina E .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.2.2 Vitamina C .....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2.3 <math>\beta</math>-caroteno.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2.4 Compostos bioativos.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Abóbora .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.1 Sementes de abóbora .....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.1.1 Propriedades terapêuticas das sementes de abóbora .....</b>	<b>29</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Delineamento Experimental .....</b>	<b>32</b>

<b>3.1.1</b>	<b>Ensaio biológico .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Grupos Experimentais .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Acompanhamento dos animais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Dietas Experimentais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Semente de abóbora.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Cálculo e composição.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Elaboração das dietas.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinações químicas e bioquímicas .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Determinações químicas da semente de abóbora e das dietas experimentais.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1.1</b>	<b>Determinação da composição centesimal da semente de abóbora e das dietas experimentais .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1.2</b>	<b>Determinação de fibras solúveis e insolúveis da semente de abóbora .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.1.3</b>	<b>Determinação dos teores de vitamina E da semente de abóbora .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.1.3.1</b>	<b>Estimativa dos teores de vitamina E nas rações experimentais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.1.3.2</b>	<b>Estimativa do consumo alimentar de nutrientes.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.1.4</b>	<b>Determinação da composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora...37</b>	
<b>3.3.2</b>	<b>Determinações bioquímicas hepáticas .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.2.1</b>	<b>Preparo do homogeneizado de fígado.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.2.2</b>	<b>Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2.3</b>	<b>Dosagem de proteínas.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2.4</b>	<b>Medida da oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX).....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2.5</b>	<b>Dosagem dos níveis de proteína carbonilada .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSAO.....</b>	<b>43</b>

<b>4.1 Avaliação química da semente de abóbora.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1 Composição centesimal e teor de fibra alimentar da semente de abóbora.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2 Conteúdo de tocoferóis da semente de abóbora.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.3 Composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2. Composição centesimal e estimativa de vitamina e das dietas experimentais.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Valores dos parâmetros estudados nos animais.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.1 Consumo de ração .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.2 Análise do consumo de nutrientes pelos animais.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.3 Peso corporal.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.4 Peso das fezes dos animais .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.5 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX) e proteína carbonilada no tecido hepático.....</b>	<b>54</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1:** Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

**Quadro 2:** Principais agentes de defesa antioxidante.

**Quadro 3 :** Fontes nutricionais dos principais compostos bioativos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição (g/kg) das dietas de acordo com os grupos experimentais.

**Tabela 2:** Composição centesimal e teor de fibra alimentar da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz -SC.

**Tabela 3:** Conteúdo de tocoferóis - vitamina E da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz -SC.

**Tabela 4:** Composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*).

**Tabela 5:** Composição centesimal das dietas experimentais.

**Tabela 6:** Estimativa da composição de tocoferóis das dietas experimentais.

**Tabela 7:** Consumo de ração diária e total (g) dos animais.

**Tabela 8:** Consumo alimentar total (g) em relação aos macronutrientes pelos animais.

**Tabela 9:** Consumo alimentar total (mg) de vitamina E ( $\alpha$ - e  $\gamma$ - tocoferol e tocoferóis totais pelos animais).

**Tabela 10:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso corporal dos animais.

**Tabela 11:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso das fezes (g) dos animais.

**Tabela 12:** Medida das concentrações de TBA-RS (nmol/mg de prot) hepático dos animais.

**Tabela 13:** Medida das concentrações de FOX (CHPE/ g peso de tecido) hepático dos animais.

**Tabela 14:** Medida das concentrações de proteína carbonilada (nmol/mg de prot) hepática dos animais.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Evolução do consumo semanal de ração (g) dos animais.

**Figura 2:** Consumo alimentar total (g) de macronutrientes pelos animais.

**Figura 3:** Evolução do peso corporal (g) dos animais dos grupos experimentais.

**Figura 4:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso das fezes (g) dos animais.

**Figura 5:** Medida das concentrações de TBA-RS (nmol/mg de prot) hepático dos animais.

**Figura 6:** Medida das concentrações de FOX (CHPE/ g peso de tecido) hepático dos animais.

**Figura 7:** Medida das concentrações de proteína carbonilada (nmol/mg de prot) hepática dos animais.

## RESUMO

Tem sido demonstrado que o consumo de sementes ricas em vitamina E, onde o  $\alpha$ -tocoferol é o isômero predominante, reduz a oxidação de lipídeos e aumenta os níveis de vitamina E plasmática em alguns órgãos, prevenindo, assim, doenças relacionadas ao estresse oxidativo. A semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) é rica em vitamina E, principalmente, o isômero  $\gamma$ -tocoferol, proteínas, lipídeos e fibras insolúveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química da semente de abóbora de uma partida cultivada em Santo Amaro da Imperatriz- SC e observar o efeito do seu consumo sobre os danos oxidativos hepáticos em ratos (*Rattus norvegicus*). A semente de abóbora foi avaliada em relação à sua composição centesimal, conteúdo de vitamina E, fibra alimentar e composição de ácidos graxos. Para verificar o efeito do consumo da semente de abóbora foi realizado um ensaio biológico com duração de 42 dias utilizando-se ratos adultos, machos, da linhagem *Wistar*, distribuídos em 3 grupos: GC (grupo controle AIN93-M); GSA (grupo semente de abóbora que recebeu como fonte de vitamina E apenas a semente) e GCS (grupo controle da semente que recebeu maior quantidade de lipídeos e fibras, similares às concentrações do GSA). Ao final do ensaio biológico os animais foram sacrificados e foram realizadas as análises de TBA-RS, FOX e proteína carbonilada no homogeneizado de fígado dos animais. A semente de abóbora apresentou 21,4g% de proteína, 28,8 g% de lipídeos e 15,3 g% de fibras alimentares. O teor de vitamina E total foi de 20,3 mg/100g, sendo 1,3 mg/100g de  $\alpha$ - tocoferol e 18,7 mg/100g de  $\gamma$ - tocoferol. O ácido graxo predominante foi o linoléico (47,7%). Foi observado um aumento significativo dos níveis de TBA-RS ( $p = 0,0007$ ), FOX ( $p = 0,03$ ) e proteína carbonilada ( $p = 0,02$ ) hepática nos animais que consumiram a semente de abóbora. Apesar da semente de abóbora apresentar níveis altos de  $\gamma$ - tocoferol, esta causou danos oxidativos nos lipídeos e proteínas hepáticas dos animais.

**Palavras-chave:** semente de abóbora, composição química, estresse oxidativo, antioxidantes

## ABSTRACT

It has been demonstrated that the consumption of vitamin E rich seeds, which tocopherol is the predominant isomer, reduces lipid oxidation and increases plasmatic vitamin levels in some organs, thus preventing illnesses related to oxidative stress. The pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) is rich in vitamin E, mainly the isomer  $\gamma$ -tocopherol, proteins, lipids and insoluble fibers. The aim of this work was to evaluate the chemical composition of pumpkin seed cultivated in Santo Amaro da Imperatriz - SC and to observe the effect of its consumption on the liver oxidative damages in rats (*Rattus norvegicus*). The pumpkin seed was evaluated in relation to its macronutrients composition, vitamin E content, total fiber and fatty acid composition. To evaluate the effect of pumpkin seed consumption a biological assay was carried through in 42 days using adult rats, males (*Wistar*) divided in 3 groups: GC (control group AIN93-M), GSA (pumpkin seed group that received vitamin E as source of vitamin from the seed) and GCS (seed control group that received greater amount of lipids and fibers which is similar to the concentrations of the GSA). In the end of the biological assay the animals were sacrificed and the analyses of TBA-RS, FOX and carbonyl protein in the liver homogenate were carried through. The pumpkin seed presented 21,4g% of protein, 28,8 g% of lipids and 15,3 g% of total fibers. Its content of total vitamin E was 20,3 mg/100g, being 1,3 mg/100g of  $\alpha$ -tocopherol and 18,7 mg/100g of  $\gamma$ -tocopherol. The mainly fatty acid was linoleic with 47,7%. It was observed a significant increase of the TBA-RS levels ( $p = 0,007$ ), FOX ( $p = 0,03$ ) and carbonyl protein ( $p = 0,02$ ) in the liver of animals that consumed pumpkin seed. Despite the pumpkin seed presenting high levels of  $\gamma$ -tocopherol this food caused oxidative damage in the lipids and protein in the animal liver.

**Key words:** pumpkin seeds, chemical composition, oxidative stress, antioxidants

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O desenvolvimento e a existência de qualquer organismo na presença de oxigênio, mesmo em condições fisiológicas normais, está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são responsáveis pelo dano oxidativo em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídeos e proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; SIES, 1991).

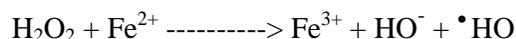
As EROs podem ser tanto radicais, que são moléculas contendo um ou mais elétrons não pareados, quanto não radicais. As mais relevantes são: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), radical hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), peróxil ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ), o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é formado, continuamente, através de diversos processos celulares, incluindo os sistemas microssomal e mitocondrial de transporte de elétrons. Outras fontes dessa molécula são a xantina desidrogenase/oxidase e outras oxidases celulares. As células mielóides contêm um complexo de transferência de elétrons associado à membrana plasmática, a nicotinamida denina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que reduz o oxigênio com a NADPH produzindo o ânion superóxido. Esse radical é considerado uma espécie pouco reativa porque não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de produção, porém pode se combinar com outras espécies como o óxido nítrico, formando uma espécie mais reativa (FANG et al., 2002; THOMAS, 2003).

O oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) é formado pela oxidação de outros intermediários reativos de oxigênio e constitui-se como um importante reativo no estresse oxidativo. Seus alvos preferenciais em reações químicas são as duplas ligações como em ácidos graxos poliinsaturados ou guanina em bases de DNA (DIPLOCK et al., 1998).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é gerado pelas mesmas fontes que produzem o ânion superóxido, pois tanto a destruição enzimática como a não enzimática deste produzem o peróxido de hidrogênio. As enzimas peroxissomais associadas com o metabolismo de ácidos graxos e as enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares, também são responsáveis pela sua formação. O peróxido de hidrogênio é considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os vários componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (THOMAS, 2003).

A reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com íons de ferro é chamada de reação de Fenton (1894) que leva à produção do radical hidroxil (•OH).



O radical hidroxil também pode ser formado a partir de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de um cátion de transição como o ferro (Fe<sup>++</sup>) ou cobre (Cu<sup>+</sup>) na reação de Haber-Weiss (1934).



O radical hidroxil é considerado a espécie mais reativa, pois é capaz de reagir com todas as biomoléculas produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. A taxa de reação do radical hidroxil é controlada por difusão limitada, portanto, a vida média deste é muito curta, reagindo no seu próprio sítio de formação (DIPLOCK et al., 1998; THOMAS, 2003).

Além das EROs, há também as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que contribuem para a lesão tecidual e formação de processos inflamatórios. Um exemplo importante de ERNs é o óxido nítrico (NO•), um radical muito reativo e abundante formado a partir da arginina, que atua como um sinal biológico oxidativo importante em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo o relaxamento do músculo liso e a redução da pressão arterial. Também pode ser produzido pela ativação de macrófagos contribuindo para a regulação da imunidade (BREDT, 1994; BECKMAN, 1996; PACKER, 1996). Um excesso do óxido nítrico é citotóxico e pode reagir diretamente com biomoléculas ou combinado com o ânion superóxido para formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), aumentando, assim, o estresse oxidativo já que este é capaz de induzir a peroxidação lipídica em lipoproteínas (BECKMAN, 1996; PACKER, 1996).

As EROs e ERN podem ser visualizadas no quadro a seguir:

**Quadro 1:** Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN)

	<b>Radicais</b>	<b>Não radicais</b>
Erro	Superóxido, $\bullet\text{O}_2^-$ Hidroxil, $\bullet\text{OH}$ Peroxil, $\text{ROO}\bullet$ Alcoxil, $\text{RO}\bullet$ Hidroperoxil, $\text{HOO}\bullet$	Peróxido de hidrogênio, $\text{H}_2\text{O}_2$ Ácido hipocloroso, $\text{HOCl}$ Ozônio, $\text{O}_3$ Oxigênio <i>singlet</i> , $^1\text{O}_2$
ERN	Óxido nítrico, $\text{NO}\bullet$ Dióxido de nitrogênio, $\text{NOO}\bullet$	Ácido nitroso, $\text{HNO}_2$ Cátion nitrosil, $\text{NO}^+$ Ânion nitrosil, $\text{NO}^-$ Tetróxido dinitrogênio, $\text{N}_2\text{O}_4$ Trióxido dinitrogênio, $\text{N}_2\text{O}_3$ Peroxinitrito, $\text{ONOO}^-$ Ácido peroxinitroso, $\text{ONOOH}$ Cátion nitrônio, $\text{NO}_2^+$ Alquil peroxinitrito, $\text{ROONO}$

(Modificado de HALLIWELL, 1996).

Os danos oxidativos induzidos nas células estão relacionados a vários processos patológicos e sabe-se, hoje, que esse dano tem uma significativa contribuição em doenças como artrite, esclerose múltipla, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, AIDS, hipertensão, entre outras (MC CORD, 2000). Além disso, os danos ocorridos no ácido desoxirribonucléico (DNA) podem levar à mutagênese e carcinogênese (MEYDANI et al., 1998).

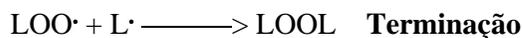
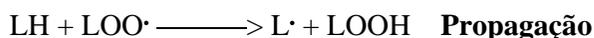
## 1.2 Estresse oxidativo

As células apresentam sistemas pró-oxidantes/antioxidantes que produzem e detoxificam oxidantes de modo contínuo durante o metabolismo aeróbio normal, porém quando ocorrem eventos oxidativos adicionais desencadeia um desequilíbrio nesses sistemas resultando em danos oxidativos às biomoléculas descritas anteriormente (SIES, 1985). O estresse oxidativo pode levar a uma alteração nos sistemas antioxidantes ao induzir ou reprimir proteínas que participam desse processo ou ao exaurir as reservas celulares de antioxidantes (SIES, 1985; THOMAS, 2003). O alvo celular primário do estresse oxidativo depende do tipo de célula, a natureza da ERO (radical ou não radical), o local da geração (intra ou extracelular) e a proximidade com o alvo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995).

Quando o dano é moderado, ocorre o aumento da síntese de defesas antioxidantes em função de restaurar o desequilíbrio, porém o estado crônico de estresse oxidativo contribui para o declínio das funções celulares, o envelhecimento, a mutação “espontânea” e numerosas patologias (FRIDOVICH, 1998; FANG et al., 2002).

O estresse oxidativo está associado a inúmeras doenças em humanos e, recentemente, tem sido considerado o fator mais importante na causa de doenças crônicas não transmissíveis (NAGI, 2001).

A consequência do estresse oxidativo mais comumente descrita na literatura científica é a peroxidação lipídica. Essa oxidação afeta substâncias prevalentes em constituintes alimentares e compromete o sabor dos alimentos e, quando ocorre na membrana celular, a função da mesma é prejudicada (THOMAS, 2003). A interação entre radicais livres e lipídeos envolve reações em cadeia em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Essas reações em cadeia podem ser verificadas abaixo, onde o “L” representa o lipídeo:



Na etapa de iniciação ocorre o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo insaturado da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}\cdot$  ou pelo radical alcóxil ( $\text{O}\cdot$ ) com

conseqüente formação do radical lipídico  $L^\bullet$ . Na propagação, o  $L^\bullet$  reage com  $O_2$ , resultando no radical peroxil ( $LOO^\bullet$ ) que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, tornando-o novamente  $L^\bullet$  e continuando a etapa da propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando  $L^\bullet$  ou  $LOO^\bullet$  se propaga até se neutralizar (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os ácidos graxos poliinsaturados encontrados nas membranas biológicas e na lipoproteína de baixa densidade (LDL) do sangue são, particularmente, vulneráveis ao processo de iniciação e propagação devido às suas múltiplas duplas ligações ao longo de sua cadeia. O dano oxidativo de membranas resulta na formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, destruindo o arranjo espacial da membrana e inativando-a, irreversivelmente. O dano oxidativo resulta também no aumento da fluidez o que irá afetar a homeostase da célula e comprometer a integridade da mesma (SIES, 1985; CLARKSON & THOMPSON, 2000; HONG et al., 2004).

A peroxidação lipídica também tem sido relacionada com a patogênese de muitas doenças degenerativas de grande incidência atual, como a diabetes e doenças cardiovasculares. Em modelos experimentais de aterosclerose, o aumento da produção de superóxidos tem sido ligado à função prejudicada da função endotelial (CAI & HARRISON, 2000; WEST, 2000; GRIENGLING & FITZGERALD, 2003).

As proteínas apresentam muitos sítios reativos que podem ser danificados durante o estresse oxidativo. Alterações ocorridas nas proteínas podem resultar em mudanças físicas, como fragmentação e agregação. Essas mudanças conformacionais fazem com que as proteínas sejam mais susceptíveis à degradação por enzimas proteolíticas (DAVIES, 1993; PACKER, 1997).

As EROs também podem ocasionar danos ao DNA e a mutação pode ser gerada pela divisão celular não reparada. Entretanto, não há mensurações diretas disponíveis para avaliar o dano *in vivo*. Se essas mudanças ocorrerem em genes críticos, tais como oncogene ou genes supressores tumorais, pode resultar na iniciação ou progressão do tumor. O dano celular causado pelas EROs pode induzir mitoses, aumentando o risco do DNA lesado acarretar mutações (MEYDANI et al., 1998). O dano oxidativo contínuo ao DNA está associado com o desenvolvimento da maioria dos cânceres, como do cólon, do pulmão, do reto e da próstata (HERCBERG et al., 1998).

### 1.3 Defesas antioxidantes

Os organismos aeróbios, dependentes do metabolismo oxidativo, em sua evolução adaptativa à atmosfera rica em oxigênio, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante para detoxificar as formas reativas de oxigênio e nitrogênio. Sob condições fisiológicas normais, o estresse oxidativo produzido é combatido por um complexo sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL, 1996; FANG, 2002).

Segundo Halliwell & Gutteridge (1989) e Sies (1993) os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra a ação dos oxidantes.

A célula pode se proteger de duas maneiras. Uma delas, atuando como detoxificadora do agente, impedindo a sua formação e, conseqüentemente, o ataque a lipídeos, proteínas e às bases do DNA. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida. Esse processo está relacionado com a remoção dos danos da molécula de DNA e a reconstituição de membranas celulares (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Muitos constituintes alimentares são fontes importantes desses agentes protetores contra a ação de radicais livres. Esses constituintes variam de vitaminas (C, E e carotenóides) e minerais (zinco, cobalto, cobre, selênio) (SIES, 1993; MEYDANI, 1998). Estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes é capaz de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelas EROs. Evidências claras também mostram que o consumo de alimentos com propriedades antioxidantes está inversamente associado ao risco de doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo (MEYDANI et al., 1998).

Os antioxidantes endógenos e exógenos atuam sinergicamente compondo um sistema antioxidante que inclui enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) e também substâncias não enzimáticas como a glutathione (GSH), vitamina E, ácido ascórbico, carotenóides, urato, alguns minerais e flavonóides (HALLIWELL, 1996; NIJVELDT et al., 2001).

No quadro 2 podem ser vistos alguns dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

**Quadro 2:** Principais agentes de defesa antioxidante.

<b>Não enzimáticos</b>	<b>Enzimáticos</b>
$\alpha$ - tocoferol e $\gamma$ -tocoferol (vitamina E)	Superóxido dismutase (SOD)
$\beta$ -caroteno	Catalase
Ácido ascórbico	NADPU-quinona oxirredutase
Flavonóides	Glutaciona peroxidase (GPx)
Proteínas plasmáticas	Enzimas de reparo
Selênio, cobre, zinco, manganês	
Glutaciona (GSH)	
L-cisteína	

**Fonte:** BIANCHI & ANTUNES, 1999.

### 1.3.1 Antioxidantes endógenos

Os antioxidantes endógenos são sintetizados no organismo humano e compõem um sofisticado sistema enzimático e não enzimático de defesa (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A superóxido dismutase (SOD) constitui-se como uma das enzimas mais importantes que atuam como antioxidante celular, estando presente nos organismos aeróbios sob três formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (DIPLOCK et al., 1998; SARNI & LEITE, 2003).

As SODs são encontradas no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço extracelular dos mamíferos e catalisam a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (reação de dismutação) (THOMAS, 2003) da seguinte maneira:



A catalase está presente em grande quantidade em quase todos os tecidos (peroxissomas) sendo escassa no cérebro, coração e músculo esquelético. Ela é componente do fígado e possui como sítio ativo um grupo heme ( $\text{Fe}^{+2}$ ) que catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado sendo convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ :



A glutathione peroxidase (GPx) é a principal peroxidase em vertebrados, sendo uma enzima que usa vários doadores de elétrons para reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Tanto a catalase como a glutathione peroxidase possuem efeito protetor no sentido de que ambas removem o peróxido de hidrogênio (SAGARA et al., 1998; SARNI & LEITE, 2003).

A glutathione (GSH) é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais e animais, constituindo-se num importante antioxidante natural. Ela pode ser proveniente da dieta ou também ser sintetizada no organismo humano, portanto ela é considerada um antioxidante endógeno e exógeno. Algumas de suas ações são servir como substrato para a glutathione peroxidase e também destoxificar metabólitos reativos de oxigênio provenientes do ambiente e do próprio organismo, agindo como agente redutor aceitando elétrons das EROs, neutralizando-os e transformando-os em espécies menos tóxicas (SAGARA et al., 1998; CLARKSON & THOMPSON, 2000).

### **1.3.2 Antioxidantes exógenos**

Entre os antioxidantes nutricionais ou exógenos, podemos citar entre os mais estudados o β-caroteno e a vitamina E, antioxidantes lipossolúveis, a vitamina C, o principal antioxidante hidrossolúvel, os compostos bioativos encontrados em plantas como os flavonóides, fitoestrógenos, licopeno e fibras e os minerais como zinco, cobre, selênio e manganês.

#### **1.3.2.1 Vitamina E**

Descoberta em 1922 por Evans e Bishop como um micronutriente essencial para a reprodução em ratos, a vitamina E foi redescoberta nos anos 50 como fator 2 por Klaus Schwarz, posicionando-se dentro do contexto do sistema celular antioxidante juntamente com os aminoácidos sulfurados (fator 1) e o selênio (fator 3). Subseqüentemente, a vitamina E provou ser efetiva contra a peroxidação lipídica e outros eventos oxidativos. Sabe-se, hoje, que a atividade antioxidante interruptora de cadeia, que previne a propagação de reações de radicais livres, é a sua função mais importante (ESTERBAUER, 1991; BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

A vitamina E ocorre na natureza em oito formas estruturais: quatro tocoferóis (α-, β-, γ-, δ-) e quatro tocotrienóis (α-, β-, γ-, δ-) (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; JIANG et al., 2001). Tanto os tocoferóis quanto os tocotrienóis possuem um anel 6-cromanol e uma cadeia lateral; esta

cadeia é de natureza isoprênica, constituída por 16 átomos de carbono, sendo responsável pela lipossolubilidade da vitamina E (BIANCHINI-PONTUSCHKA & PENTEADO, 2003).

Os diferentes isômeros desses compostos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) diferem entre si pelo número e pela posição de grupos metil no anel cromanol. A forma  $\alpha$ - tocoferol é predominante em tecidos humanos e a principal em suplementos nutricionais. A forma  $\gamma$ - tocoferol é a mais abundante em sementes de plantas e seus produtos, possuindo aspectos únicos que a distinguem do  $\alpha$ - tocoferol (JIANG et al., 2001). O  $\alpha$ - tocoferol é o mais potente na doação de elétrons e é também considerado o mais potente antioxidante interruptor de cadeia, inibindo a peroxidação lipídica (KAMAL-EDIN, APPELQVIST, 1996). Entretanto, o  $\gamma$ - tocoferol parece ser mais hábil em seqüestrar mutágenos eletrofílicos nos compartimentos lipofílicos como espécies reativas de nitrogênio, principalmente, o peroxinitrito, protegendo, desse modo, lipídios, proteínas e o DNA. Também observou-se que o  $\gamma$ - tocoferol complementa a ação da glutatona que, similarmente, realiza a varredura de mutágenos eletrofílicos na fase aquosa da célula (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; JIANG et al., 2001).

Apesar do  $\alpha$ - tocoferol apresentar uma maior biopotência *in vivo*, o  $\gamma$ - tocoferol, como já visto, é predominante em muitos alimentos, sendo, assim, considerado relevante pela sua larga distribuição (COHN, 1997). Os óleos vegetais, o gergelim e as oleaginosas são fontes ricas em  $\gamma$ - tocoferol e, devido à sua ampla distribuição em alimentos, esse isômero corresponde a, aproximadamente, 70% da vitamina E consumida em uma dieta norte americana (JIANG et al., 2001). Em contraste, o  $\alpha$ - tocoferol é a forma predominante da vitamina E em muitos tecidos de seres humanos e animais. Em humanos, a concentração de  $\alpha$ - tocoferol no plasma é de 4 a 10 vezes maior que a de  $\gamma$ - tocoferol. Entretanto, Burton et al (1998) reportaram que o  $\gamma$ - tocoferol constitui-se de 30 a 50% do total de vitamina E na pele, músculo e tecido adiposo de humanos. Handelman et al (1994) observaram que a suplementação de  $\alpha$ - tocoferol suprime a concentração de  $\gamma$ - tocoferol no tecido e no plasma. Em contraste com esse dado (CLEMENT & BOURRE 1997) foi observado que a suplementação de  $\gamma$ - tocoferol levou a um aumento significativo da concentração de ambos os isômeros.

Como já mencionado, a principal função da vitamina E em seres humanos é atuar como antioxidante lipossolúvel interruptor de cadeia, que age prevenindo a propagação das reações dos radicais livres nas membranas biológicas (CLARKSON & THOMPSON, 2000; TRABER, 2003). Ela é um potente seqüestrador do radical peroxil protegendo os ácidos graxos insaturados dentro dos fosfolipídios das membranas e nas lipoproteínas plasmáticas. Os hidroperóxidos lipídicos, quando oxidados a radicais peroxil, produzem uma reação mil vezes maior com a vitamina E que

com os ácidos graxos insaturados, pois o grupamento hidroxil fenólico do tocoferol reage com um radical orgânico peroxil formando o hidroperóxido orgânico correspondente e o radical tocoferoxil (Vitamina E -O<sup>•</sup>) (TRABER, 2003). O radical tocoferoxil formado migra da dupla camada lipídica para o meio aquoso reagindo com a vitamina C, sendo oxidado e retornando à sua forma estável. A vitamina C e a glutathione são capazes de realizar essa regeneração da vitamina E, já que são doadores de hidrogênio. No entanto, esse fenômeno depende da oferta de antioxidantes hidrossolúveis e da atividade metabólica das células (TRABER, 2003; MEYDANI, 1998).

A atividade antioxidante da vitamina E tem levado estudiosos a avaliar a sua habilidade para prevenção de doenças crônicas, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo como doenças cardiovasculares, câncer e desordens neurodegenerativas (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; TRABER, 2003).

### **1.3.2.2 Vitamina C**

A vitamina C é considerada um dos mais poderosos antioxidantes naturais. Ela é solúvel em água, sendo encontrada em altas concentrações em muitos tecidos e reage diretamente com o ânion superóxido, radical hidroxil e oxigênio *singlet* (CLARKSON & THOMPSON, 2000). Como mencionado no item anterior, há evidências de estudos *in vitro* que a vitamina C é capaz de reagir com o radical tocoferoxil (Vitamina E -O<sup>•</sup>) que é formado na inibição da peroxidação lipídica pela vitamina E regenerando-o em tocoferol (RIOS & PENTEADO, 2003; TRABER, 2003).

Porém, estudos *in vitro*, também observaram que o alto consumo de vitamina C pode ser deletério e apresentar efeitos pró-oxidantes por reduzir o íon férrico (Fe<sup>+3</sup>) a íon ferroso (Fe<sup>+2</sup>), que pode catalisar a reação de Fenton produzindo o radical hidroxil e causando peroxidação lipídica. Porém, esses efeitos não foram observados *in vivo* (DRAPER & BETTGER, 1994; ODIN, 1997).

### **1.3.2.3 β-caroteno**

O β-caroteno é, quantitativamente, o mais importante e mais ativo dos carotenóides e é considerado um potente antioxidante originado das plantas, sendo que as EROs mais eficientemente neutralizadas pelo β-caroteno são o oxigênio *singlet* e o radical peroxil (FANG et al., 2002; ALMEIDA-MURADIAN & PENTEADO, 2003). Assim, como a vitamina E, o β-caroteno também pertence ao grupo de antioxidantes lipofílicos presentes em lipoproteínas como a

lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL). Sendo assim, ele protege contra a peroxidação lipídica nos tecidos (FANG et al., 2002). O conhecimento da ação protetora dos carotenóides, especialmente do  $\beta$ -caroteno, contra os danos oxidativos justifica o seu efeito benéfico à saúde prevenindo, assim, doenças originadas pelo estresse oxidativo (ALMEIDA-MURADIAN & PENTEADO, 2003).

#### **1.3.2.4 Compostos bioativos**

O interesse em compostos bioativos tem crescido muito nos últimos anos. Esses compostos podem ser definidos como constituintes extra-nutricionais, ou seja, constituintes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde (KITTS, 1994). Os alimentos ricos nesses compostos são os grãos integrais, verduras, legumes, frutas, oleaginosas e sementes, além dos produtos originados destes (BRUCE et al., 2000). Os compostos bioativos contêm vários grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos. Eles se caracterizam como sendo potenciais agentes redutores e sua capacidade antioxidante está envolvida com o número e o padrão de disposição desses grupamentos hidroxila (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Evidências sugerem que os compostos bioativos possuem atividades biológicas que influenciam em funções metabólicas protegendo contra o risco de doenças crônico-degenerativas como câncer, diabetes mellitus, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, entre outras (MEYDANI et al., 1998).

Os compostos bioativos podem ser divididos em compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, que incluem os flavonóides, os fitoestrógenos e os resveratróis; licopeno, compostos organosulfurados, fitoesteróis e fibras dietéticas (KRIS-ETHERTON et al., 2002). No quadro a seguir são apresentados alguns exemplos desses compostos e suas fontes nutricionais.

**Quadro 3 :** Fontes nutricionais dos principais compostos bioativos.

<b>Composto</b>	<b>Fonte nutricional</b>
Flavonóides (catequina, quercetina)	Cebola, maçã, chás, azeitona, brócolis, vinho tinto, cacau
Flavonóis (epicatequina)	Chá verde e preto, cacau, chocolate
Fitoestrógenos (lignanas, enterodial), isoflavonas (genisteína, daidzeína) e resveratrol	Semente de abóbora, linhaça, gergelim, soja, legumes, uva, vinho tinto e amendoim
Licopeno	Tomate e seus derivados
Compostos organosulfurados (alicina, mercaptano)	Alho, cebola
Fibras solúveis ( $\beta$ -glucana, pectina)	Vegetais, aveia, frutas, grãos
Fitoesteróis (sitostanol, stigmasterol, campesterol)	Óleo de soja, sementes, nozes

**Fonte:** KRIS-ETHERTON et al., 2002.

Os fitoestrógenos são polifenóis estruturalmente difenólicos (2-fenilnaftaleno) similares ao estrógeno e que também se ligam aos receptores de estrógeno (ZAVA & DUWE, 1997). Entretanto, eles atuam tanto como agonistas e antagonistas parciais de estrógeno, possuindo ações similares e opostas ao mesmo (SETCHELL & CASSIDY, 1999). A ação dos fitoestrógenos como agonistas ou antagonistas do estrógeno é dependente da concentração dietética consumida, do nível de estrógeno endógeno, do sexo e do *status* da menopausa. O efeito estrogênico pode ser protetor contra doenças relacionadas a hormônios como o câncer de mama, de próstata, cólon e outros e também em relação a doenças cardiovasculares, sintomas da menopausa e osteoporose. Os fitoestrógenos protegem contra a ação do estrógeno reduzindo a quantidade de estrógeno circulante no organismo (BINGHAM et al., 1998; KURZER & XU, 1997). Como outros compostos bioativos, os fitoestrógenos também possuem propriedades antioxidantes prevenindo contra outros tipos de cânceres. Eles têm demonstrado promover a supressão de tumores induzidos pela formação do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Porém, fatores como absorção de

fitoestrógenos, duração da exposição aos mesmos e influência de outros componentes permanecem incertos, necessitando de mais estudos (KURZER & XU, 1997; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

As lignanas são fitoestrógenos encontrados em menores concentrações nas plantas e estão envolvidos na formação da parede celular das mesmas. As lignanas do tipo secoisolariciresinol possuem atividades antioxidantes, estrogênicas, antiestrogênicas, antivirais, antifúngicas e inseticidas, entretanto, os níveis de exposição e a concentração responsáveis por esses efeitos ainda estão sendo investigados (MAZUR & ADLERCREUTZ, 1998; MURKOVIC, 2004).

## **1.4 Abóbora**

A abóbora (*Cucurbita pepo*) é um vegetal originário das Américas do Norte e Central e atualmente, é cultivada ao redor do mundo. O vegetal é pertencente à família *Cucurbitaceae* que compreende, aproximadamente, 760 espécies distribuídas em todo o mundo. A família inclui pepinos, melões, abobrinhas e melancias (ZITTER et al., 1998).

Apesar de não serem utilizadas com frequência na indústria de alimentos, as abóboras são consumidas no mundo todo. Os frutos podem ser utilizados cozidos, tanto na forma salgada como na forma doce e também podem ser fermentados e utilizados como realçadores de sabor em sopas e molhos. As sementes podem ser utilizadas tostadas como castanhas ou como óleo para saladas, muito consumido, principalmente, em países europeus (MURKOVIC, 1996; LAZOS, 1995).

De acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar - POF (IBGE, 2004), o consumo *per capita* de abóbora aumentou de 1,4 kg para 4,6 kg, no Brasil, entre os anos de 2002 e 2003.

### **1.4.1 Semente de abóbora**

A semente de abóbora é oval-oblonga, achatada e mais afilada em uma de suas extremidades. Possui coloração branca ou amarelada com reflexos esverdeados em ambas as faces (OLIVEIRA et al., 1991 apud CARAMÉZ, 2000).

Na Grécia, a semente de abóbora é consumida em quantidades consideráveis na forma torrada e salgada. Na Áustria, o óleo da semente de abóbora é muito apreciado para tempero de saladas em função de seu aroma e gosto característicos (LAZOS, 1995; MURKOVIC et al., 1996; EL ADAWY & TAHA, 2001).

A semente de abóbora pode ser considerada boa fonte de proteína (320g/kg) e óleo (450 g/kg), possibilitando o seu uso na fortificação de alimentos e aumentando, assim, as concentrações

protéicas de preparações alimentares, além de reduzir custos na produção, uma vez que as sementes, geralmente, não são utilizadas para esse fim (MANSOUR et al., 1999; EL-SOUKKARY, 2001).

El Adawy & Taha (2001) também avaliaram a composição da semente de abóbora em pó e concluíram que esta apresentou boa digestibilidade *in vitro* (90%), um considerável teor de minerais como ferro (10,9 mg/100g), magnésio (10,9 mg/100g), fósforo (1090 mg/100g), potássio (982 mg/100g) e manganês (8,9 mg/100g), porém baixo teor de cobre e zinco. Kreft et al. (2002) observaram que o óleo da semente é pobre em iodo e selênio.

De acordo com Murkovic (1996), o óleo da semente de abóbora possui propriedades antioxidantes sendo rico em vitamina E, principalmente  $\gamma$ - tocoferol e  $\alpha$ - tocoferol. O autor considera que o consumo de 69 g de sementes por dia é necessário para alcançar a recomendação de 15 mg/dia de acordo com o *Dietary Reference Intake* (RDI, 2000).

A semente de abóbora possui fitoestrógenos do tipo lignana. O composto secoisolariciresinol constitui-se como a mais abundante lignana da semente e seu conteúdo é de, aproximadamente, 21 mg/100g (base seca), porém a fonte mais conhecida desse composto é a semente de linhaça, contendo 270 mg/100g (base seca) (MAZUR et al., 1996; MAZUR & ADLERCREUTZ, 1998).

Os fitoesteróis são caracterizados como substâncias presentes em plantas e parecem estar relacionados à redução do colesterol, redução de alguns tipos de câncer e na melhora da função imune (AWAD & FINK, 2000). Philips et al (2005) estudaram esses compostos presentes em várias sementes e encontraram 265 mg/100g de fitoesteróis totais na semente de abóbora. Os autores observaram que os resultados encontrados foram semelhantes aos observados na semente de girassol e de linhaça. Em contrapartida, o estudo de Murkovic et al (2004) observou uma menor concentração (171 mg/100g) desses fitoesteróis na semente de abóbora.

Fruhirth et al (2003) observaram que, devido ao óleo da semente de abóbora não ser processado, ele mantém as propriedades antioxidantes, que geralmente são removidas durante o processamento, o que não ocorre com os óleos refinados.

#### **1.4.1.1 Propriedades terapêuticas da sementes de abóbora**

A semente de abóbora possui um componente chamado cucurbitacina que possui ação anti-helmíntica. Em estudos clínicos com humanos foi observado que as sementes podem ser benéficas para pessoas com infestação de vermes. A semente de abóbora é utilizada em alguns países por apresentar essa ação vermífuga (QUEIROZ-NETO et al., 1994). Em estudos realizados com animais infectados, as sementes de abóbora também apresentaram resultados benéficos em relação a esses problemas (MAHMOUD et al., 2002).

Carbin et al. (1990) avaliaram, em um estudo clínico randomizado, 53 pacientes com hiperplasia benigna da próstata que consumiram o extrato de sementes de abóbora durante 3 meses. Os resultados do estudo mostraram que os indivíduos apresentaram melhora nas funções da bexiga e da uretra, como o fluxo de urina, o tempo e frequência de micção.

Quanhong et al. (2003), em um estudo para verificar a ação hipoglicêmica do óleo da semente de abóbora, observaram que ratos diabéticos tratados com esse óleo, intragastricamente, por 10 dias, obtiveram uma melhor tolerância à glicose.

O óleo da semente administrado de maneira isolada, sem a utilização de medicamentos, em ratos hipertensos durante 4 semanas, mostrou um efeito terapêutico benéfico e retardou a progressão da hipertensão. Quando os animais foram pré-tratados com óleo por 4 semanas e receberam as drogas captopril e felodipina observou-se uma ação hipotensiva significativa. Os autores concluem que esses resultados podem ser explicados devido ao alto teor de tocoferóis presentes no óleo da semente de abóbora que, quando administrados com medicamentos, podem produzir um efeito benéfico importante (AL-ZUHAIIR et al., 2000).

Utilizado, concomitantemente, com drogas anti-hipercolesterolêmicas, o óleo de semente de abóbora mostrou ter um efeito potencializador de medicamentos. Os efeitos colaterais da utilização da droga como tonturas, enjôos e dores de cabeça também foram reduzidos. Os autores concluem que os efeitos positivos na redução do LDL-colesterol e aumento do HDL-colesterol ocorreram, provavelmente, devido ao conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes presentes no óleo de semente de abóbora (AL-ZUHAIIR et al., 1997).

Fahim et al (1995), em um estudo realizado com ratos com artrite, compararam os efeitos do óleo da semente de abóbora com os efeitos da droga endometacina, um reconhecido antiinflamatório. Os autores verificaram que o óleo da semente de abóbora administrado durante 22 dias mostrou ter um potencial efeito antiinflamatório, principalmente, na fase crônica da doença. Isso pôde ser observado pela modulação dos parâmetros alterados na artrite como níveis de

glutaciona e atividade sérica da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase e presença de edema. Os autores obtiveram um padrão similar dos resultados do óleo da semente e da endometacina, exceto que o uso da droga elevou os níveis de peroxidação lipídica no fígado.

Dois estudos clínicos realizados com crianças de 2 a 7 anos de idade, moradores de uma área hiper-endêmica de oxalcrystalúria na Tailândia, mostraram que o consumo de sementes de abóbora (60 mg/Kg de peso), como petisco, pode ajudar a prevenir a formação de cálculos na bexiga. A semente de abóbora reduziu os níveis de substâncias que promovem a formação de cálculos na urina como cristais de cálcio-oxalato e aumentou os níveis das substâncias que inibem sua formação como o fósforo, pirofostato e glicosaminoglicans (SUPHAKARN et al., 1989; SUPHIPHAT et al., 1993).

Recentemente, muita atenção tem sido dada à utilização de produtos que, geralmente, não são utilizados pela indústria de alimentos e pela população. Apenas uma parte dos alimentos é utilizada diretamente para o consumo humano, sendo o restante desperdiçado. A utilização desses produtos eliminados poderia contribuir na produção de novos produtos alimentícios e, ao mesmo tempo, minimizar os problemas com desperdício de alimentos, particularmente, em países subdesenvolvidos. Porém, para que isso ocorra é necessário realizar pesquisas sobre esses alimentos e, conseqüentemente, poder orientar o consumo dos mesmos.

Observa-se a ausência de estudos que avaliem a composição química da semente de abóbora, especialmente da espécie *Cucurbita pepo*, cultivada no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química da semente de abóbora e também observar o efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo a lipídeos e proteínas hepáticos no fígado de animais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a composição química da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) e o efeito do seu consumo sobre o dano oxidativo a lipídeos e proteínas hepáticos em ratos (*Rattus norvegicus*).

### **2.2 Específicos**

- Analisar a composição centesimal da semente de abóbora;
- Analisar o teor de vitamina E da semente de abóbora;
- Analisar o conteúdo de fibras solúveis e insolúveis da semente de abóbora;
- Determinar a composição de ácidos graxos do óleo e da semente de abóbora;
- Analisar a composição centesimal das rações experimentais;
- Estimar o teor de vitamina E das rações experimentais;
- Determinar a variação ponderal dos animais;
- Monitorar o consumo de ração dos animais nos grupos experimentais;
- Avaliar o peso das fezes dos animais nos grupos experimentais;
- Medir o dano oxidativo aos lipídeos hepáticos dos animais;
- Determinar o dano oxidativo às proteínas hepáticas dos animais.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Delineamento Experimental

#### 3.1.1 Ensaio Biológico

No ensaio biológico foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*), adultos e machos, da linhagem *Wistar*, com peso médio de 380g e com 80 dias de vida. Esses animais têm sido utilizados em estudos que envolvem os antioxidantes, a avaliação do estresse oxidativo ou a utilização de sementes (VAN DAM et al., 1999; AL-ZUHAIR et al., 2000). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os animais foram aclimatados às condições da sala de experimento durante 30 dias, acondicionados em caixas de polipropileno, em sala com temperatura controlada (22° a 24° C) e iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

#### 3.1.2 Grupos experimentais

Após o período de aclimação, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, de aço inoxidável, nas mesmas condições descritas no item acima. Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n = 6) segundo o tipo da dieta oferecida:

**Grupo Controle (GC):** os animais receberam dieta controle preconizada pelo AIN-93M para a manutenção da vida de animais adultos (REEVES et al., 1993).

**Grupo semente de abóbora (GSA):** os animais receberam dieta controle AIN-93M (REEVES et al., 1993) modificada de acordo com a quantidade de proteína, lipídeo, fibra e vitamina E encontrados na semente de abóbora em pó.

**Grupo controle da semente (GCS):** os animais receberam dieta controle AIN-93M (REEVES et al., 1993) modificada contendo maior quantidade de fibras e lipídeos, similares às concentrações do GSA já que a dieta do GSA é rica em fibras e lipídeos.

### **3.1.3 Acompanhamento dos animais**

Os animais foram alimentados com as dietas experimentais durante 42 dias. As avaliações do consumo de ração de acordo com o método resto ingestão e a limpeza das gaiolas foram realizadas três vezes por semana. A avaliação do peso corpóreo foi realizada duas vezes por semana.

Nos últimos 7 dias do experimento, as fezes dos animais de cada grupo experimental foram coletadas, pesadas e registradas.

### **3.1.4 Aspectos éticos**

Os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com a legislação vigente e o protocolo da Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Projeto nº 328/2005).

## **3.2 Dietas experimentais**

### **3.2.1 Semente de abóbora**

As abóboras da espécie *Cucurbita pepo*, maduras, foram adquiridas no município de Florianópolis-SC, sendo que todas foram provenientes da mesma partida de abóboras em Santo Amaro da Imperatriz-SC. A colheita foi realizada no mês de março de 2005. As sementes foram retiradas das abóboras, selecionadas, lavadas em água corrente para retirar todos os resíduos do vegetal e colocadas para secar em estufa de ar circulante (*Fanem, 320-SE*) à temperatura controlada de 45 a 55° C durante 48 horas. Após a completa secagem, as sementes foram trituradas, em moinho, para a formação da semente em pó.

### **3.2.2 Cálculo e composição**

O cálculo e a composição das 3 rações experimentais foram baseados segundo a recomendação do *American Institute of Nutrition (AIN-93M)* (REEVES et al., 1993) (Tabela 1).

A dieta experimental do grupo semente de abóbora (GSA) foi modificada de acordo com as concentrações de lipídeos, proteínas, fibras e vitamina E, obtidas da análise da composição centesimal (Tabela 2) e do conteúdo de vitamina E da semente em pó (Tabela 3), já que todos os ingredientes das dietas estavam em forma de pó e, conseqüentemente, mais concentrados devido à perda de umidade.

A quantidade de vitamina E para 1 kg de ração, segundo AIN-93M (REEVES et al., 1993), é de 75 mg, o que corresponde a 276 g de semente de abóbora (considerando os isômeros de maior contribuição na semente: ( $\alpha$ - tocoferol e  $\gamma$ - tocoferol) da semente de abóbora em pó (Tabela 3).

A dieta experimental do grupo controle da semente (GCS) foi baseada na proporção de fibras e lipídeos da dieta do GSA, devido à grande concentração desses componentes encontrados na semente de abóbora (Tabela 1).

**Tabela 1:** Composição (g/kg) das dietas de acordo com os grupos experimentais.

<b>Ingredientes</b>	<b>GC</b>	<b>GSA</b>	<b>GCS</b>
Caseína	140	60	140
Sacarose	100	100	100
Amido de milho	620,27	514,74	545,9
Óleo de soja	40	-	107,5
Colina	2,5	2,5	2,5
L-Cistina	1,8	1,8	1,8
Celulose	50	-	57,26
Mistura de Minerais	35	35	35
Mistura Vitamínica	10	-	10
Mist. Vitamínica s/ vit. E	-	9,925	-
Tert Butilhidroquinona	0,029	0,029	0,029
Semente de abóbora em pó	-	276	-
Total	1000	1000	1000

**GC:** grupo controle, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

### **3.2.3 Elaboração das dietas**

As dietas experimentais foram elaboradas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os ingredientes em pó das rações (Tabela 3) foram pesados, individualmente, peneirados e misturados até que se obteve a completa homogeneização. O óleo de soja foi adicionado apenas ao final e, então, a mistura foi peneirada e misturada novamente. Os grãos que permaneceram na peneira foram triturados com gral e pistilo de porcelana e incorporados novamente à mistura.

Após a preparação, as rações foram acondicionadas em sacos plásticos hermeticamente fechados com selador e identificados de acordo com o grupo experimental. As rações foram mantidas sob refrigeração em *freezer* a -18° C e ao abrigo da luz.

### **3.3 Determinações químicas e bioquímicas**

#### **3.3.1 Determinações químicas da semente de abóbora em pó e das dietas experimentais**

##### **3.3.1.1 Determinação da composição centesimal da semente de abóbora em pó e das dietas experimentais**

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina de acordo com os procedimentos utilizados nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985.

As análises de umidade foram realizadas por gravimetria após secagem total do material em estufa regulada a 105 °C. As cinzas foram determinadas por gravimetria após incineração do material em mufla a 550 °C. O extrato etéreo foi determinado em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente, e as proteínas foram determinadas em método de digestão *Kjeldahl* e foi empregado o fator de 6,25 para a conversão do nitrogênio em proteínas.

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença (fração *nifext-nitrogen free extract*) somando-se os valores referentes às determinações de umidade, cinzas, proteínas, extrato etéreo e fibra bruta, subtraindo o resultado de 100.

Foi realizado também o cálculo do valor energético de acordo com os fatores multiplicadores: 4 para proteínas e carboidratos e 9 para lipídeos (DUTRA-DE-OLIVEIRA & MARCHINI, 1998).

### **3.3.1.2 Determinação de fibras solúveis e insolúveis da semente de abóbora**

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Cereais da Universidade Federal de Santa Catarina pelo método enzimático gravimétrico preconizado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). As amostras desengorduradas foram tratadas com amilase, protease e amilglicosidase, de forma sucessiva, seguida pela adição de 4 volumes de etanol a 95% para a precipitação e posterior determinação por gravimetria. Os resíduos foram lavados com etanol e, após secagem, as cinzas e proteínas desse resíduo foram determinadas separadamente e deduzidas do mesmo para chegar ao valor real de fibra alimentar total.

### **3.3.1.3 Determinação dos teores de vitamina E da semente de abóbora**

A análise foi realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL-SP) e foram determinadas as formas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, e  $\gamma$ -tocoferol por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) com método proposto por Brubacher et al (1985).

#### **3.3.1.3.1 Estimativa dos teores de vitamina E nas rações experimentais**

Os cálculos para estimar a quantidade de vitamina E nas rações experimentais foram baseados na quantidade dos isômeros  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol presentes na semente de abóbora em pó e  $\alpha$ -tocoferol da mistura vitamínica.

#### **3.3.1.3.2 Estimativa do consumo alimentar de nutrientes**

O cálculo da estimativa do consumo alimentar de macronutrientes e vitamina E ( $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol e tocoferóis totais) foi baseado no consumo de ração total dos animais e na quantidade desses nutrientes em 1 kg de ração.

### **3.3.1.4 Determinação da composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora**

A análise foi realizada pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da Universidade de Campinas/SP, por cromatografia gasosa, com coluna capilar de acordo com método CE 1-62 proposto pela American Oil of Chemists' Society (AOCS, 1998). A composição qualitativa foi determinada por comparação no cromatógrafo dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área sendo expressa como porcentagem em massa.

### **3.3.2 Determinações bioquímicas hepáticas**

#### **3.3.2.1 Preparo do homogeneizado de fígado**

O preparo do homogeneizado de fígado para utilização nas determinações químicas foi realizado nos Laboratórios de Nutrição Experimental e de Nutrição Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **Preparo das soluções:**

**Cloreto de potássio (KCl) a 1,15%:** Foram diluídos 1,15 g de KCl em água destilada q.s.p. 100 mL.

**Solução salina a 0,9%:** Foram diluídos 9 g de cloreto de sódio (NaCl) em água destilada q.s.p. 1000 mL.

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados em câmara com éter etílico. O fígado foi submetido à perfusão com 20 mL de solução salina a 0,9%. Após a perfusão, o órgão foi retirado, limpo de todos os resíduos, lavado 1 (uma) vez em solução salina e por 2 (duas) vezes em solução de KCl a 1,15, e pesado.

Em seguida, 1 g de tecido foi separado, picado, colocado dentro de um tubo de vidro grosso e adicionado 9 mL de solução de KCl a 1,15%. O tecido picado foi homogeneizado em *Ultra-turrax (GlasCol)* por 45 segundos. O homogeneizado de fígado foi colocado em tubos de ensaio e centrifugado (*Beckman Coulter Avanti J-25*) à temperatura de 0 a 4° C por 10 minutos a 1000 g (cerca de 3000 rpm). Para a realização da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), FOX, de proteína total e de proteína carbonilada, foi utilizado o

sobrenadante. Durante todos os procedimentos, os tecidos/homogeneizados foram mantidos em isopor com gelo.

### 3.3.2.2 Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

O malondialdeído (MDA) e outros aldeídos formados pela quebra dos ácidos graxos poliinsaturados são utilizados como parâmetros para determinar a extensão da peroxidação lipídica. Essa quebra reage com o ácido tiobarbitúrico, que produz uma substância correlacionada com dano celular (BUEGE & AUST, 1978).

Para a verificação da influência do consumo da semente de abóbora sobre a peroxidação lipídica no fígado dos animais foi realizada a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Essa análise foi determinada no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com Buege & Aust (1978) e Halliwell & Gutteridge (1995).

#### **Preparo das soluções:**

**TCA (ácido tricloroacético) a 10%:** foram diluídos 50 g de TCA em água MilliQ q.s.p. 100 mL. Após, 20 mL dessa solução foram diluídos em água MilliQ q.s.p. 100 mL.

**TBA (ácido tiobarbitúrico) a 0,67% :** foram diluídos 0,67 g de TBA em água MilliQ q.s.p. 100 mL.

Foram pipetados 500 µL de cada amostra e 500 µL de água destilada em tubos de ensaio. Foram adicionados 1500 µL de TCA, agitados em *Vortex (Quimis)* por 3 segundos e centrifugados a 1000 g por 3 minutos à temperatura de 0 a 4°C. Após isso, 1000 µL do sobrenadante foram pipetados em um tubo de ensaio resistente ao calor e adicionados 1000 µL de TBA a 0,67%, agitados novamente em *Vortex* por 3 segundos e colocados em banho-maria a 100°C por 30 minutos. Foi lido em espectrofotômetro (*Spectrumlab*) a 535 nm. Para a obtenção dos resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Cálculo: } \frac{\text{Absorbância} \times \text{Vol. Final (1000 mL)}}{(1,56 \times 10^{-5}) \times \text{vol. Amostra}}$$

### 3.3.2.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com o método proposto por Lowry et al. (1951).

#### **Preparo das soluções:**

**Reativo A:** bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 2% em hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) a 0,1N. Foram diluídos 0,4 g de  $\text{NaOH}$  em água destilada q.s.p. 100 mL. Após, foram diluídos 2 g de ( $\text{NaHCO}_3$ ) na solução preparada anteriormente.

**Reativo B<sub>1</sub>:** sulfato de cobre ( $\text{SO}_4\text{Cu}5\text{H}_2\text{O}$ ) a 1%. Foram diluídos 0,1 g de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  em água destilada q.s.p.10 mL.

**Reativo B<sub>2</sub>:** tartarato de sódio e potássio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ ) a 2%. Foram diluídos 0,2 g de  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  em água destilada q.s.p.10 mL.

**Reativo C (Fresco):** Reativo A (50 mL) + Reativo B<sub>1</sub> (0,5 mL) + Reativo B<sub>2</sub> (0,5 mL)

**Reagente de Folin a 1/3 :** foi diluído a 1/3 em água destilada.

**Solução de albumina bovina:** foi diluído 1 mg de albumina para 1 mL de água destilada.

O padrão utilizado foi a solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. Foram utilizados volumes de 50, 100 e 150  $\mu\text{L}$  a fim de obter um fator de correção. Foram pipetados 20  $\mu\text{L}$  do homogeneizado de fígado em 0,8 mL de água destilada, acrescidos de 2 mL do reativo C. Foi aguardado um período de 10 minutos e, logo após, foram pipetados 0,2 mL do reagente de Folin a 1/3. Após 30 minutos, essa solução foi lida em espectrofotômetro (*Cary IE-UV*) a 625 nm. Os dados das amostras foram multiplicados pelo fator de correção, obtendo-se a quantidade de proteína por volume de homogeneizado (mg prot./mL).

### 3.3.2.4 Medida da oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)

Essa análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando-se o método proposto por HERMES LIMA, et al (1995). Essa medida é baseada na oxidação do Fe (II) por LOOH em um pH ácido na presença de um corante xilenol laranja. A reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o Fe (II) em pH ácido na presença de xilenol laranja induz a formação de um complexo Fe (III) xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra somente um

pico de 440 nm e essa absorvância cresce linearmente com o aumento da concentraçãõ do corante. A análise avalia a concentraçãõ de hidroperóxido lipídico na amostra.

#### **Preparo das soluções:**

**Sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) [1mM]:** foram diluídos 0,196 g de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em água destilada q.s.p. 500 mL.

**Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [0,25 M]:** foram diluídos 1,38 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em água destilada q.s.p. 100 mL.

**Xilenol laranja [1mM]:** foram diluídos 0,3803 g em água destilada q.s.p. 500 mL.

**Hidroperóxido de cumeno [1 mM]:** foram diluídos 0,018 mL em H<sub>2</sub>O destilada q.s.p.100 mL.

As soluções preparadas foram misturadas nos seguintes volumes: 250 µL de Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 µL de xilenol laranja. Foram adicionados 60 µL do homogeneizado de fígado e 490 µL de água destilada, a fim de ajustar o volume final para 1 mL. Para a preparaçãõ do branco o volume do homogeneizado foi substituído por água destilada. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas. A absorvância foi medida em 580 nm. Após essa leitura foram adicionados 5 µL de hidroperóxido de cumeno e, aguardados 60 min, foi lido novamente em 580 nm.

A concentraçãõ dos hidroperóxidos lipídicos foi expressa em equivalente a hidroperóxido de cumeno por grama de tecido (CHPE/g) através da seguinte fórmula:

$$\text{CHPE/g peso do tecido} = (\text{Abs.}_{\text{amostra}} / \text{Abs.}_{5 \text{ nmol CHP}}) \times 5 \text{ nmol CHP} \times 1000 / V \times 6$$

V = volume do extrato de amostra usado

6 = fator de diluiçãõ 1:5 g/v.

#### **3.3.2.5 Dosagem dos níveis de proteína carbonilada no tecido**

A formaçãõ de proteína carbonilada é aceita como um fenômeno comum de oxidaçãõ de proteínas. A determinaçãõ de proteína carbonilada possui algumas vantagens quando comparada aos produtos da peroxidaçãõ lipídica, já que esta se forma mais cedo e, geralmente, é mais estável do que os produtos da peroxidaçãõ lipídica (DALLE-DONNE et al., 2003).

A dosagem dos níveis de proteína carbonilada no homogeneizado de fígado foi determinada no Laboratório de Nutriçãõ Experimental e no Laboratório de Bioquímica Experimental da

Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com o método proposto por Abraham et al (1994).

O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas, formando hidrazonas que podem ser detectadas espectrofotometricamente. É uma técnica com alta reprodutibilidade que pode detectar níveis de carbonilas em vários sistemas (REZNICK & PACKER, 1994).

**Preparo das soluções:**

**Guanidina a 6 M (PM 95,53):** Foram diluídos 5,73 g em ácido clorídrico (HCl) 2,5 M q.s.p. 10 mL

**2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM:** Foram diluídos 19,8 mg em ácido clorídrico (HCl) 2,5 M q.s.p. 10 mL

**Tricloacético (TCA) a 20 % :** Foram diluídos 20 g em água destilada q.s.p. 100 mL.

**Tricloacético (TCA) a 10 %:** Foram diluídos 10 g em água destilada q.s.p. 100 mL..

**Etanol – acetato de etila:** Misturar os dois reagentes 1:1 (V/V), 40 mL: 20:20 mL

**Para a curva da albumina:**

0,2 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 0,5 mg/mL;

0,4 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1 mg/mL;

0,6 mg albumina / 0,4 mL de guanidina corresponde a 1,5 mg/mL.

Foi colocado 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de homogeneizado de fígado. Para cada amostra foi realizado um branco (para medir a quantidade de proteína da amostra) onde foi colocado 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de HCl 2,5M. Ambos os tubos foram incubados por uma hora, no escuro, e agitados a cada 15 minutos. Foi adicionado 1 mL de solução de TCA a 20% em ambos os tubos sendo, depois, colocados no gelo por 10 minutos e centrifugados por 5 minutos em centrífuga refrigerada (*Beckman Coulter Avanti J-25*) (4° C) a 1000 g sendo descartado o sobrenadante. Ao precipitado de ambos os tubos foi acrescentado 0,8 mL de TCA a 10% e, depois, agitado com um bastão de vidro . Foi centrifugado novamente por 5 minutos.

O precipitado foi lavado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila. Em cada lavagem foi realizada a centrifugação.

Após a última lavagem o precipitado foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6 M e colocado em banho-maria com agitação por 10 minutos a 37<sup>0</sup> C sendo, após, lido em espectrofotômetro (*Cary IE-UV*) a 360 nm. O branco foi lido a 280 nm.

Os dados da absorbância foram multiplicados por 45,45 nmol/mg e dividido pela concentração de proteínas obtida no branco, obtendo-se, assim, a concentração de carbonilas no tecido.

### **3.4 Análise estatística**

Os dados são apresentados em forma de tabelas e figuras, representados por média e erro padrão.

Para realização das figuras foi utilizado o software *Microsoft Excel 98*. Na análise estatística foi utilizado o *software GraphPad Instat*, versão 3.

Para as variáveis verificadas no experimento (peso corporal, consumo de ração, peso do fígado, peso das fezes, medida de TBA-RS, FOX e proteína carbonilada) na comparação entre os três grupos experimentais (GC, GSA e GCS), foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida de teste *pos-hoc* de *Tukey*.

Em todos os testes estatísticos foi considerado um nível mínimo de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As diferenças estatisticamente significantes foram representadas através de letras diferentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação química da semente de abóbora

#### 4.1.1 Composição centesimal e teor de fibra alimentar da semente de abóbora

Os valores referentes à composição centesimal e ao teor de fibra alimentar (solúvel e insolúvel) da semente de abóbora podem ser observados na tabela a seguir.

**Tabela 2:** Composição centesimal e teor de fibra alimentar da semente de abóbora e da semente de abóbora em pó (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz-SC.

Componentes	Semente de abóbora	Semente de abóbora em pó
Umidade g%	29,24	4,30
Proteína bruta g%	21,43	28,98
Cinzas g%	2,37	3,21
Extrato etéreo g%	28,80	38,95
Fibras solúveis g%	3,10	4,20
Fibras insolúveis g%	12,23	16,55
Fração Nifext g%	2,83	3,81
Energia Kcal (100 g)	356,16	481,71

Os dados, acima, demonstram que a semente de abóbora possui alto teor de lipídeos (28,80 g%). O conteúdo de lipídeos da semente de abóbora encontra-se em proporções similares a outras sementes como de algodão (22,9 g%) e de soja (21,0 g%) (ESUSOSO et al., 1998).

Murkovic et al (1996), avaliando sementes de abóboras cultivadas na Eslovênia, obtiveram resultados diferentes, encontrando um maior conteúdo de lipídeos, cerca de 40%. Younis et al (2000) avaliaram sementes de abóboras cultivadas em altas e baixas altitudes no continente Africano. Os resultados de conteúdo de óleo (cerca de 24 g%) foram semelhantes aos resultados do presente estudo quando avaliaram a semente de abóbora cultivada em baixas altitudes (com temperatura mais alta) e cerca de 35 g% para os frutos cultivados em altas altitudes (com

temperatura mais baixa). Os autores demonstraram com esse estudo que o local e o clima de cultivo têm grande influência sobre o teor de óleo encontrado nas sementes.

Os dados da tabela 4 também demonstram que a semente de abóbora é rica em proteínas (21,43 g%). O conteúdo de proteínas encontrado na semente de abóbora pode ser comparado com outras sementes amplamente consumidas pela população, como as sementes de girassol (19,8 g%) e de amendoim (25,5 g%) (MC CANCE et al., 1994). Mansour et al (1993, 1999) observam que a semente de abóbora exibe propriedades funcionais únicas como alta absorção de água e gordura e possui também propriedades emulsificante, o que sugere a habilidade da incorporação da semente de abóbora em produtos de padaria. El Soukkary (2001) também afirma que com o seu alto conteúdo de proteínas e lipídeos, a semente de abóbora qualifica-se como uma boa fonte de nutrientes, podendo ser utilizada para o aumento do valor nutricional de pães e bolos.

Em relação aos aminoácidos presentes na semente de abóbora, El-Adawy & Taha (2001) observaram, em um estudo realizado no Egito, que o aminoácido limitante na semente de abóbora é a lisina, como observado nos cereais, porém faz-se necessária a realização de estudos para avaliar os aminoácidos presentes na semente de abóboras cultivadas no Brasil.

A semente de abóbora constitui-se em boa fonte de fibra alimentar sendo seu conteúdo de 15,33 g%, predominando maior quantidade de fibra insolúvel (12,23 g%) (Tabela 4). Esse resultado encontra-se abaixo do resultado obtido por um estudo realizado com sementes de abóboras cultivadas no estado de Santa Catarina, porém da espécie *Cucurbita moschata* que encontrou um teor de 23,44 g% de fibra alimentar, predominando também a fibra insolúvel sobre a solúvel (CARAMEZ, 2000). As variações entre as espécies de abóbora e a maturação das sementes também podem contribuir para as diferenças de valores de fibra nas sementes.

#### **4.1.2 Conteúdo de tocoferóis da semente de abóbora**

Os dados da tabela 3 mostram os valores referentes ao conteúdo de tocoferóis da semente de abóbora.

**Tabela 3:** Conteúdo de tocoferóis - vitamina E da semente de abóbora e da semente de abóbora em pó (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz- SC.

<b>Tocoferol</b>	<b>Semente de abóbora</b>	<b>Semente de abóbora em pó</b>
$\alpha$ - tocoferol (mg/100 g)	1,36	1,84
$\beta$ - tocoferol (mg/100 g)	<0,01	<0,02
$\delta$ - tocoferol (mg/100 g)	0,25	0,35
$\gamma$ - tocoferol (mg/100 g)	18,71	25,32
Tocoferol total (mg/100 g)	20,32	27,51
Vitamina E (UI/100 g)	5,93	8,00
Vitamina E expressa como $\alpha$ -tocoferol	3,91	5,29

Os óleos vegetais e as oleaginosas são as fontes alimentares que mais contém vitamina E, especialmente os óleos de gérmen de trigo, de girassol, de soja e de milho (MURKOVIC et al., 1996).

Na determinação do conteúdo de tocoferóis da semente de abóbora observa-se que o  $\gamma$ - tocoferol (18,71 mg/100 g) é o isômero predominante na semente de abóbora seguido do  $\alpha$ - (1,36 mg/100 g),  $\delta$ - (0,25 mg/100 g) e  $\beta$  - tocoferol (<0,01 mg/100 g). O mesmo resultado ocorreu com o estudo de Murkovic et al (1996) que encontraram valores semelhantes quando avaliaram sementes de abóbora cultivadas na Áustria.

Murkovic et al (2004) analisaram as mudanças químicas que ocorrem na semente de abóbora durante o processo de fabricação do óleo (tostagem) e observaram que o conteúdo de vitamina E da semente não permanece constante durante essa etapa, sendo reduzido no início do aquecimento devido às reações de oxidação, porém voltando aos níveis iniciais quando o processo termina e o óleo emerge da estrutura celular. Os autores encontraram um conteúdo médio de  $\alpha$ - tocoferol de 3,75 mg em 100 g de semente e de  $\gamma$ - tocoferol de 38,3 mg por 100 g, portanto valores superiores em relação ao presente estudo. Também foi observado nesse estudo que apenas o conteúdo de tocoferóis voltou aos níveis iniciais e que não ocorreu o mesmo para os tocotrienóis presentes na semente, indicando uma baixa estabilidade desses compostos.

Assim como na semente de abóbora, o  $\gamma$ - tocoferol é a forma predominante de outras sementes como a de gergelim, colza, linhaça e também em oleaginosas (LECHNER et al., 1999; YAMASHITA et al., 2003).

#### 4.1.3 Composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora

Os resultados encontrados para a composição de ácidos graxos do óleo e da semente de abóbora encontram-se na tabela abaixo.

**Tabela 4:** Composição de ácidos graxos do óleo e da semente de abóbora em pó (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz-SC.

Ácido Graxo		Óleo de semente de abóbora (%)	Semente de abóbora em pó (%)*
C14:0	Mirístico	0,16	0,05
C16:0	Palmítico	11,54	3,32
C16:1	Palmitoléico	0,11	0,03
C18:0	Esteárico	9,49	2,73
C18:1	Oléico	30,00	8,64
C18:2	Linoléico	47,70	13,74
C18:3	Linolênico	0,20	0,06
C20:0	Araquídico	0,52	0,15
C20:1	Gadoléico	0,08	0,02
C22:0	Behênico	0,12	0,03
C24:0	Lignocérico	0,08	0,02
<b>AGS</b>		<b>21,91</b>	<b>6,31</b>
<b>AGM</b>		<b>30,19</b>	<b>8,69</b>
<b>AGP</b>		<b>47,90</b>	<b>13,0</b>

\*Estimativa do conteúdo de ácidos graxos da semente de abóbora em pó, através da quantidade de extrato etéreo da mesma (38,95 g%, tabela 2).

AGS: ácidos graxos saturados; AGM: ácidos graxos monoinsaturados; AGP: ácidos graxos polinsaturados.

Os resultados ilustrados na tabela 6 mostram que os ácidos graxos predominantes no óleo da semente de abóbora são o ácido graxo linoléico (47,7%), o oléico (30,0%), o palmítico (11,54%) e o esteárico (9,49%). Em um estudo avaliando a composição de ácidos graxos do óleo da semente de abóbora cultivadas na África foi observado dados semelhantes a este estudo, sendo que os ácidos graxos linoléico (43,0%) e oléico (34%) foram os predominantes (YOUNIS et al., 2000). Os dados do presente estudo também estão em concordância com resultados obtidos por Murkovic et al (1996) que, dentre 100 linhagens de *Cucurbita pepo*, encontraram como ácidos graxos predominantes, o linoléico (35,6% a 60,8%) e o oléico (21,0% a 46,9%).

O predomínio do ácido graxo linoléico, por ser poliinsaturado, qualifica o óleo da semente de abóbora como um óleo benéfico à saúde. Estudos demonstram que o consumo dietético de ácido graxo linoléico está associado com a redução de doenças cardiovasculares (DJOUSSE et al., 2001; RASTOGI et al., 2004).

Uma questão presente na elaboração e/ou recomendação de dietas para pacientes portadores de doenças cardiovasculares é, principalmente, a proporção ideal entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dentro do consumo total de gordura (LIMA et al., 2000).

A *Dietary Reference Intakes* (DRI, 2001) recomenda que o consumo de gordura da dieta seja de 30% das calorias totais. A recomendação para ácidos graxos saturados é de menos de 10% das calorias totais da dieta, para ácidos graxos monoinsaturados de 10% a 15% das calorias totais e para ácidos graxos poliinsaturados de até 10% das calorias totais, sendo que as recomendações indicam uma proporção de ácidos graxos linoléico/linolênico desde 5:1 até 10:1. Portanto, é necessário um equilíbrio entre o aporte desses dois ácidos graxos através da dieta.

#### **4.2 Composição centesimal e estimativa de vitamina E das dietas experimentais**

Os valores referentes à composição centesimal e estimativa de tocoferóis das dietas experimentais podem ser observados nas tabelas 5 e 6 a seguir.

**Tabela 5:** Composição centesimal das dietas experimentais.

<b>Componentes</b>	<b>GC</b>	<b>GSA</b>	<b>GCS</b>
Umidade g%	8,88	8,56	8,07
Proteína bruta g%	10,56	12,85	11,18
Cinzas g%	2,51	3,23	2,70
Extrato etéreo g%	6,65	11,61	11,22
Fibra bruta g%	3,24	3,67	3,74
Fração Nifext g%	68,16	60,08	63,09
Energia (Kcal/100g)	374,73	396,21	398,06

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

**Tabela 6:** Estimativa da composição de tocoferóis das dietas experimentais\*.

<b>Componentes</b>	<b>GC</b>	<b>GSA</b>	<b>GCS</b>
$\alpha$ -tocoferol (mg/100 g)	7,50	0,51	7,50
$\gamma$ - tocoferol (mg/100`g)	-----	6,99	-----
Tocoferol total (mg/100 g)**	7,50	7,50	7,50

\*Cálculo realizado através do conteúdo dos componentes da dieta (Tabela 1 e 2): da semente de abóbora em pó (GSA) e  $\alpha$ -tocoferol da mistura vitamínica (GC e GCS).

\*\* Tocoferol total:  $\alpha$ - tocoferol e  $\gamma$ - tocoferol.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

### 4.3 Valores dos parâmetros estudados nos animais

#### 4.3.1 Consumo de ração

O consumo de ração diário e total (42 dias de experimento) dos animais pode ser visualizado na tabela 7. A figura 1 mostra dados sobre a evolução do consumo da ração por semana dos animais.

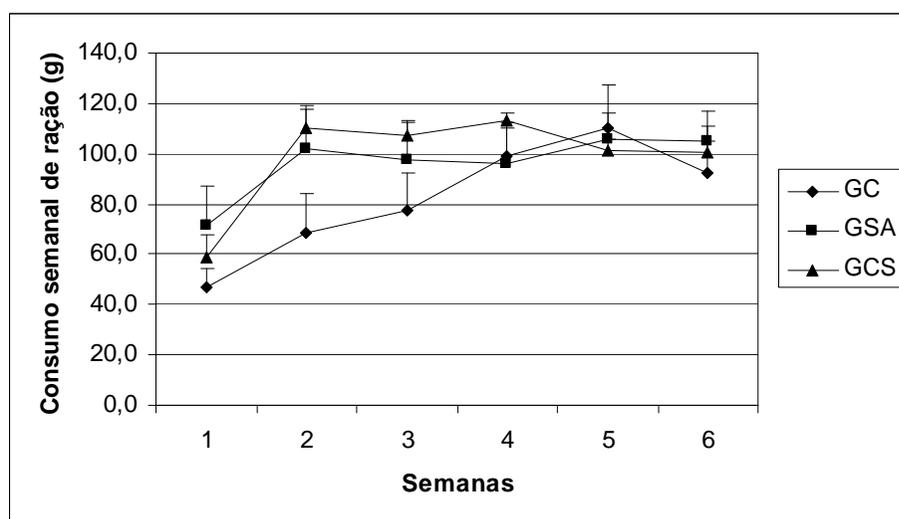
**Tabela 7:** Consumo de ração diário e total (g) dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
Consumo de ração diário (g)	10,7 ± 1,81	13,8 ± 1,83	14,8 ± 0,5
Consumo de ração total (g)	449,1 ± 76,3	580,2 ± 76,7	620,6 ± 52,8

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

Sem diferença estatística,  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.



**Figura 1:** Evolução do consumo semanal de ração (g) dos animais dos grupos experimentais. Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

No presente trabalho podemos observar que apesar dos animais do GC terem consumido uma menor quantidade de ração, os testes estatísticos realizados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 7). Os dados da figura 1 mostram que os animais aumentaram o consumo de ração a partir da 2ª semana de experimento e, ao longo das semanas, o consumo de ração dos grupos foi variável.

#### 4.3.2 Análise do consumo de nutrientes pelos animais

Na tabela 8 podem ser visualizados os resultados do consumo de macronutrientes, fibra e energia pelos animais.

**Tabela 8:** Consumo alimentar total em relação a macronutrientes pelos animais.

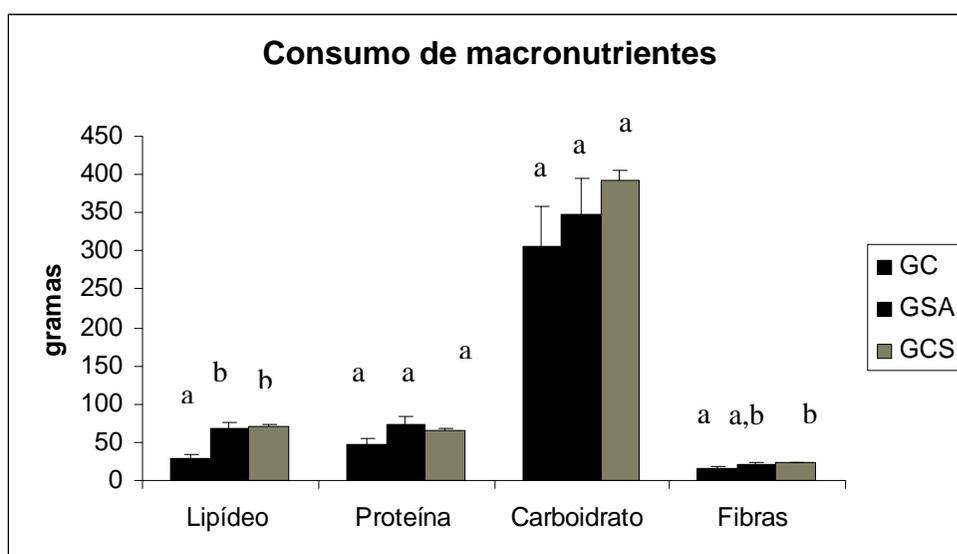
Macronutriente	GC	GSA	GCS
Lipídeo (g)	29,8 ± 5,1 <sup>a</sup>	67,3 ± 8,9 <sup>b</sup>	69,6 ± 2,4 <sup>b</sup>
Proteína (g)	47,4 ± 8,0 <sup>a</sup>	74,5 ± 9,8 <sup>a</sup>	65,5 ± 2,3 <sup>a</sup>
Carboidrato (g)	306,1 ± 52,0 <sup>a</sup>	348,6 ± 47,0 <sup>a</sup>	391,55 ± 13,5 <sup>a</sup>
Fibras (g)*	14,53 ± 2,5 <sup>a</sup>	21,29 ± 2,8 <sup>a,b</sup>	23,21 ± 0,8 <sup>b</sup>
Calorias (Kcal)	1682,9 ± 286,0 <sup>a</sup>	2299,0 ± 304,0 <sup>a</sup>	2470,5 ± 85,2 <sup>a</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

\*Fibra bruta



**Figura 2:** Consumo alimentar total (g) em relação a macronutrientes pelos animais. Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

Na análise do consumo de lipídeo, o GC foi o grupo que apresentou o menor consumo desse nutriente quando comparado aos dois outros grupos ( $p < 0,01$ ). O GSA e GCS não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 8). Apesar da ração dos GSA e GCS conter uma maior densidade de lipídeos (hiperlipídica) (Tabela 1), estes não consumiram quantidades menores em gramas de ração (Tabela 7), conseqüentemente os animais apresentaram um maior consumo de lipídeos totais (Tabela 8).

Quando comparados em relação ao consumo de fibras, observamos que o GC apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao GCS, mas isso não ocorreu quando comparado ao GSA (Tabela 8).

Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa com respeito ao consumo de proteínas, carboidratos e calorias (Tabela 8).

Na tabela a seguir pode ser verificado o consumo alimentar total (mg) de  $\alpha$ - e  $\gamma$ - tocoferol e tocoferóis totais pelos animais

**Tabela 9:** Consumo alimentar total (mg) de  $\alpha$ - e  $\gamma$ - tocoferol e tocoferóis totais pelos animais.

Componentes	GC	GSA	GCS
$\alpha$ - tocoferol (mg)	37,01 $\pm$ 5,35 <sup>a</sup>	2,94 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	44,36 $\pm$ 2,57 <sup>a</sup>
$\gamma$ - tocoferol (mg)	0	40,43 $\pm$ 4,53	0
Tocoferol total (mg)	37,01 $\pm$ 5,35 <sup>a</sup>	43,37 $\pm$ 4,88 <sup>a</sup>	44,36 $\pm$ 2,57 <sup>a</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

Quando a análise do consumo alimentar total de  $\alpha$ - tocoferol foi realizada, observamos que os GCS e GC não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, porém, apresentaram diferença em relação ao GSA (tabela 9). Isso pode ser explicado pela menor quantidade de  $\alpha$ - tocoferol na semente de abóbora (tabela 6) já que o isômero predominante da semente é o  $\gamma$ - tocoferol (tabela 3). O único grupo que consumiu  $\gamma$ - tocoferol foi o GSA, não havendo necessidade de aplicação de testes estatísticos quanto a esse parâmetro. Em relação ao consumo de tocoferol total, os grupos não foram diferentes, estatisticamente, entre si (Tabela 9).

#### 4.3.3 Peso corporal

A tabela 10 e a figura 3 mostram a variação do peso dos animais dos diferentes grupos experimentais após os 42 dias de experimento.

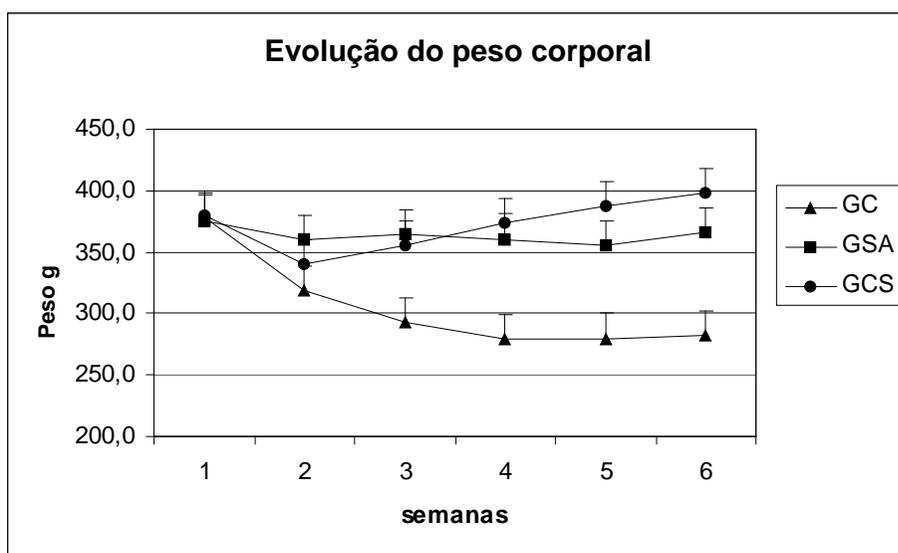
**Tabela 10:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso corporal dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
Peso inicial (g)	378,11 ± 9,7 <sup>a</sup>	375,94 ± 6,9 <sup>a</sup>	379,11 ± 8,0 <sup>a</sup>
Peso final (g)	281,31 ± 43,06 <sup>a</sup>	366,21 ± 35,71 <sup>a,b</sup>	397,14 ± 8,80 <sup>b</sup>
Varição do peso (g)	-98,15 ± 33,11 <sup>a</sup>	-20,61 ± 31,80 <sup>a,b</sup>	8,86 ± 11,51 <sup>b</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.



**Figura 3:** Evolução do peso corporal (g) dos animais dos grupos experimentais. Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GSA:** grupo semente de abóbora, **GCS:** grupo controle da semente.

Os animais do GCS apresentaram o maior ganho de peso corporal ao final do experimento, porém esses resultados foram diferentes e estatisticamente significantes apenas quando comparados aos animais do GC e não do GSA. Uma hipótese para que os animais do GC terem perdido peso, foi em função do consumo da ração ter sido menor.

#### 4.3.4 Peso das fezes dos animais

A tabela 11 e a figura 4 mostram o peso das fezes coletadas, diariamente, na última semana de experimento.

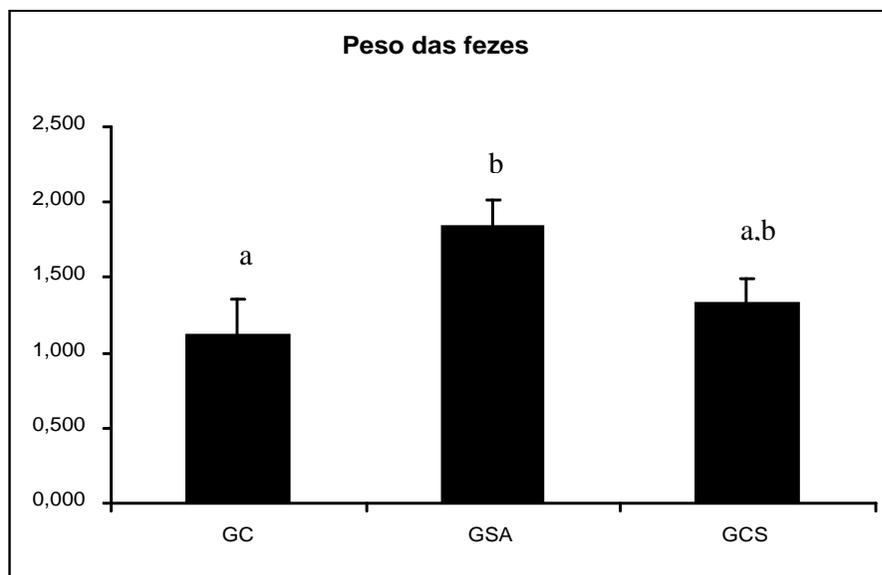
**Tabela 11:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso das fezes (g) dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
Peso das fezes diário (g)	1,11 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,11 <sup>a,b</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.



**Figura 4:** Efeito das dietas experimentais sobre o peso das fezes (g) dos animais.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

Sabe-se que a fibra insolúvel tem maior propriedade de aumentar o bolo fecal do que a fibra solúvel (GOVERS et al., 1999). Foi observado maior conteúdo fecal no GSA onde a semente de abóbora era a única fonte de fibra, com 3,10% de fibra solúvel e 12,23% de insolúvel (Tabela 2). O GCS que recebeu celulose na mesma proporção da fibra do GSA, não apresentou diferença estatística com o GSA e GC. Uma hipótese para que isso tenha ocorrido talvez seja o número reduzido de animais em cada grupo ( $n = 8$ ). Considerando a variação biológica e se o número de animais, por grupo, fosse maior talvez houvesse diferença estatisticamente significativa. Importante ressaltar que a dieta com menor teor de fibra (GC) apresentou menor peso fecal, porém foi estatisticamente significativo apenas com o GSA (Tabela 11 e Figura 4).

#### 4.3.5 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), FOX e proteína carbonilada no tecido hepático

A tabela 12 e a figura 5 mostram os resultados obtidos da medida das concentrações de TBA-RS.

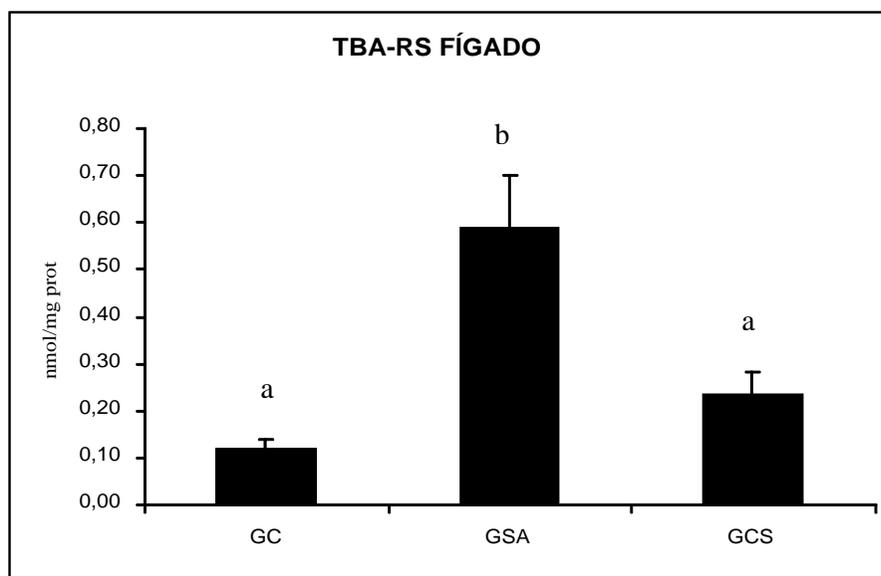
**Tabela 12:** Medida das concentrações de TBA-RS (nmol/mg prot) hepático dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
TBA-RS nmol/mg prot	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,05 <sup>a</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.



**Figura 5:** Medida das concentrações de TBA-RS (nmol/mg de ptn) hepático dos animais.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média. a,b valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

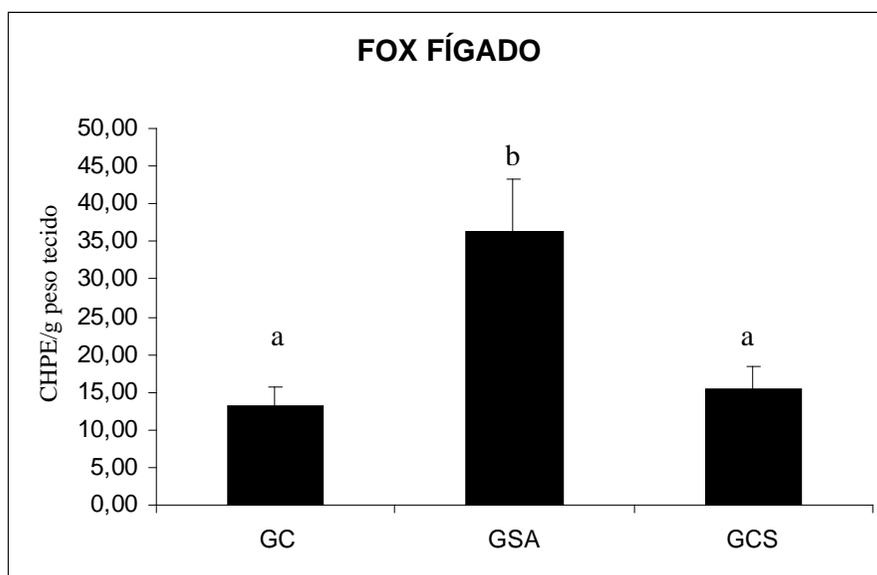
Quando a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada no fígado dos animais, o grupo que recebeu semente de abóbora (GSA) mostrou níveis maiores e significantes em relação ao GC e ao GCS ( $p < 0,001$ ), observando condição de peroxidação lipídica hepática nos animais do GSA.

A tabela 13 a figura 6 mostram os resultados obtidos através da medida FOX.

**Tabela 13:** Medida das concentrações de FOX (CHPE/ g peso de tecido) hepático dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
FOX (CHPE/ g peso de tecido)	13,11 ± 2,45 <sup>a</sup>	36,36 ± 6,99 <sup>b</sup>	15,31 ± 3,12 <sup>a</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora. Os valores estão representados como média e erro padrão da média.



**Figura 6:** Medida das concentrações de FOX (CHPE/g peso tecido) hepático dos animais.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média. a,b valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

Os resultados da medida de FOX foram semelhantes à medida de TBA-RS, onde o GSA obteve os maiores níveis de FOX (CHPE/g de tecido) e estatisticamente diferente em relação aos GCS e GC. Esse resultado confirma a peroxidação lipídica induzida pelo consumo da semente de abóbora.

O GSA apresentou os maiores níveis de TBA-RS e FOX hepático que, ao contrário do GC e do GCS, recebeu vitamina E proveniente apenas da semente de abóbora. O isômero predominante da semente é o  $\gamma$ - tocoferol, que, já mencionado anteriormente, tem menor afinidade pela proteína carreadora de  $\alpha$ - tocoferol (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; JIANG et al., 2001). Porém, como pode ser verificado a seguir, estudos realizados utilizando outras sementes ricas em  $\gamma$ - tocoferol, como o gergelim, não observaram o mesmo resultado.

Em um estudo para avaliar a capacidade antioxidante da farinha de gergelim, um grupo de coelhos consumiu por 90 dias uma dieta contendo 10% da farinha de gergelim e outro grupo

consumiu uma dieta controle nas mesmas proporções de fibras e gorduras presentes na semente. Ao final do experimento o grupo que consumiu a farinha de gergelim apresentou níveis de TBA-RS reduzidos e  $\gamma$ - e  $\alpha$ - tocoferol aumentados em relação ao grupo controle (KANG et al., 1999). É importante ressaltar que esses autores adicionaram  $\alpha$ -tocoferol na dieta dos dois grupos, o que não ocorreu no nosso delineamento experimental, pois o objetivo era observar os efeitos da semente de abóbora como fonte de vitamina E.

Em um estudo que teve o delineamento experimental similar ao do presente estudo, porém utilizando o gergelim e avaliando a concentração de vitamina E, Yamashita et al (1992) mostraram que quando adicionaram o gergelim na ração este elevou a concentração de  $\gamma$ - tocoferol no fígado e no plasma de ratos alimentados com uma dieta isenta de  $\alpha$ - tocoferol adicional.

Em outro estudo, Yamashita et al (2003) compararam o consumo de semente de linhaça, gergelim, óleo de linhaça enriquecido com sesaminol (o fitoestrógeno lignana presente na semente de gergelim), e de uma dieta isenta em vitamina E sobre os níveis de  $\gamma$ - e  $\alpha$ - tocoferol no fígado e sobre a peroxidação lipídica hepática de ratos. Ao final de 42 dias, os autores observaram que o grupo gergelim e o de óleo de linhaça com sesaminol apresentaram maiores níveis de  $\gamma$ - tocoferol quando comparados com a semente de linhaça e dieta isenta em vitamina E. A concentração de  $\alpha$ - tocoferol no grupo semente de linhaça também foi menor do que a dos outros grupos, porém, foi similar a do grupo isento em vitamina E. Os autores pressuporam que o gergelim e sua lignana sesaminol possuem propriedades que elevam os níveis de  $\gamma$ - e  $\alpha$ - tocoferol, o que não ocorre na linhaça. O grupo que consumiu semente de linhaça apresentou um aumento significativo dos níveis de TBA-RS hepático em relação ao grupo gergelim, óleo de linhaça com sesaminol e isento de vitamina E. O gergelim que é uma semente rica em  $\gamma$ - tocoferol apresentou os menores níveis de TBA-RS. Também foi observado que, quando foi adicionado o composto sesaminol na dieta com óleo de linhaça, esse composto suprimiu completamente a indução dos níveis altos de TBA-RS. Os autores referiram que o alto conteúdo de ácido graxo linolênico na semente de linhaça pode ter induzido esse aumento dos níveis de TBA-RS, já que o óleo de milho adicionado às rações é rico em ácido graxo linoléico e baixo em ácido graxo linolênico. No presente estudo, não podemos justificar o aumento da peroxidação lipídica pelo aumento da concentração de ácido graxo linolênico, já que o ácido graxo linoléico é predominante na ração do GSA proveniente da semente de abóbora (tabela 4) e na ração do GC e do GCS proveniente do óleo de soja (United States Department of Agriculture, USDA, 2006).

Um estudo realizado por Ratnayake et al (1992) observou que o consumo de semente de linhaça por ratos reduziu os níveis de vitamina E no plasma. Os autores observaram que, apesar da

lignana secoisolaricireinol apresentar propriedades antioxidantes, ela também pode causar a redução dos níveis de  $\alpha$ - e  $\gamma$ - tocoferol no plasma. Em contrapartida, Kamal-Edin et al (2002) adicionaram 4 g de sesaminol por Kg da dieta pobre em vitamina E de ratos e, ao final de 4 semanas, os animais apresentaram níveis significativamente menores de colesterol e maiores de  $\gamma$ - tocoferol no plasma e no fígado. Os autores atribuíram esse resultado a esta lignana presente no gergelim.

Frank et al (2004) extraíram a lignana secoisolaricireinol da semente de linhaça e misturaram a 1% na dieta de ratos. Após 27 dias de experimento, o consumo do extrato pelos animais causou um aumento no colesterol hepático e uma redução dos níveis de  $\alpha$ - e  $\gamma$ - tocoferol no plasma e no fígado. Os autores concluíram com esse estudo que a lignana secoisolaricireinol possui, realmente, um efeito redutor de vitamina E em ratos, entretanto eles observam que isso não pode ser explicado até o momento.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, foi observado que não existem estudos que tenham avaliado o consumo da semente de abóbora sobre os danos oxidativos a lipídeos e proteínas. A semente de linhaça é amplamente estudada e possui composição química similar à da semente de abóbora. Ambas são sementes ricas em proteína (aproximadamente 20 a 30%) contendo também alta concentração de lipídeos (aproximadamente 30 a 40%), porém a linhaça é mais rica em ácido graxo linolênico que a semente de abóbora. O conteúdo de vitamina E dessas sementes é, em sua maior parte na forma, de  $\gamma$ -tocoferol e, finalmente, ambas possuem a mesma lignana do tipo secoisolaricireinol, tendo a linhaça 270 mg/100 g e a semente de abóbora 21 mg/100 g (MAZUR et al., 1996; MAZUR & ADLERCREUTZ, 1998; SICILIA et al., 2003; YAMASHITA et al., 2003). Esses fatores sugerem que o aumento dos níveis de TBA-RS hepático no GSA pode ser devido à concentração da lignana do tipo secoisolaricireinol presente na semente de abóbora.

Outra hipótese a ser observada é a presença da substância cucurbitacina nos vegetais da família *Cucurbitaceae*. A cucurbitacina é um composto tóxico para muitos organismos, incluindo mamíferos como os seres humanos (MIRÓ, 1995). Diferentes formas de cucurbitacinas foram identificadas, porém não foram encontradas referências sobre a identificação desse agente na semente de abóbora. O pepino, pertencente à mesma família da abóbora, possui a cucurbitacina C, que age como repelente para insetos (RICE et al., 1981). Autores de um outro estudo não realizaram a identificação de cucurbitacina, mas avaliaram os efeitos toxicológicos de doses orais do extrato de semente de abóbora da espécie *Cucurbita máxima*, em ratos e suínos, e observaram que o consumo desta não causou diferenças quando comparada ao grupo controle em relação à creatinina, uréia, proteína total, contagem de leucócitos e células vermelhas e hemoglobina (QUEIROZ-NETO et al., 1994).

A cucurbitacina também foi estudada como agente inibidor da proliferação do linfócito T e está sendo utilizada no tratamento da asma e artrite, que são doenças mediadas por esse linfócito (SMIT et al., 2000).

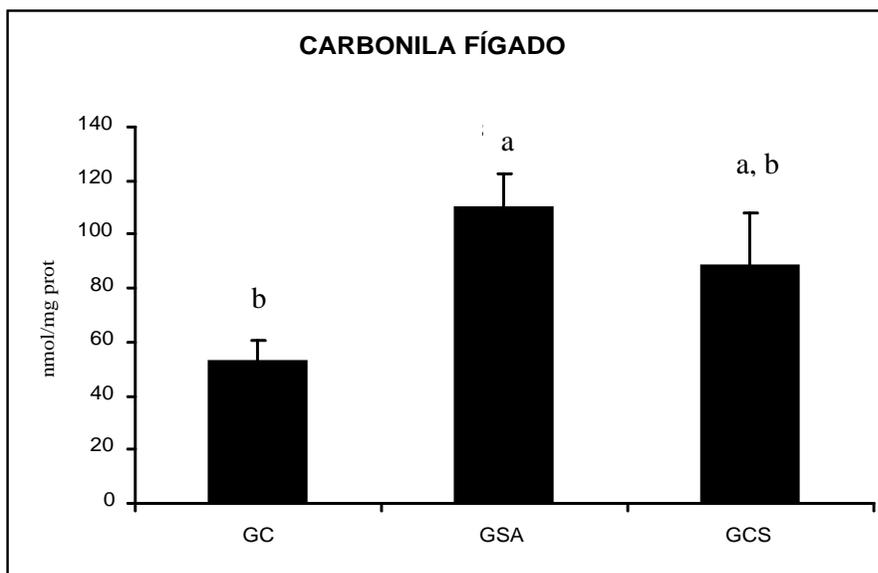
A tabela 14 e a figura 7 mostram os resultados obtidos da medida das concentrações de proteína carbonilada.

**Tabela 14:** Medida das concentrações de carbonila (nmol/mg de prot) hepática dos animais.

Grupos Experimentais	GC	GSA	GCS
Carbonila nmol/mg prot	1,20 ± 1,17 <sup>b</sup>	2,92 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,53 <sup>a,b</sup>

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora. Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b em linha: valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.



**Figura 7:** Medida das concentrações de carbonila (nmol/mg de ptn) hepática dos animais.

**GC:** grupo controle AIN-93M, **GCS:** grupo controle da semente, **GSA:** grupo semente de abóbora.

Os valores estão representados como média e erro padrão da média.

a,b valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05$  – ANOVA/Teste de Tukey.

Os animais que ingeriram dieta contendo semente de abóbora (GSA) apresentaram o maior nível de proteína carbonilada, porém essa diferença foi significativa apenas quando comparada ao do GC. A tendência do aumento da oxidação protéica hepática do GCS, uma vez que apresentou semelhança estatística com GSA e GC (Tabela 13; Figura 6), pode ser próprio da dieta com maior conteúdo de lipídeos e energia do que GC (Tabela 5).

Prasanthi et al (2005) observaram que, quando o óleo de gergelim foi administrado em ratos que tiveram estresse oxidativo induzido pela substância química fenvalerato, os níveis de proteína carbonilada foram reduzidos quando comparados aos animais que não receberam o óleo de gergelim.

Em pessoas hiperlipidêmicas que consumiram um bolinho enriquecido com semente de linhaça, foram dosados indicadores de dano oxidativo, níveis de proteína carbonilada, e indicadores de proteção, níveis de proteína tiol. Em relação à proteína carbonilada não houve diferença entre as pessoas que consumiram o bolinho com linhaça e sem linhaça. Entretanto, quando os pesquisadores avaliaram o grupo de proteína tiol, observaram que o grupo que consumiu o bolinho enriquecido com semente de linhaça obteve níveis reduzidos desse composto. Isso indica que houve diminuição das defesas induzida pelo alimento em questão (JENKINS et al., 1999).

Observa-se que o GSA apresentou maiores níveis de oxidação de lipídeos (Tabelas 12 e 13 e Figuras 5 e 6) e maiores níveis de oxidação protéica hepática (Tabela 14 e Figura 7). Podemos dizer que a semente de abóbora afetou, em maior proporção, os lipídeos do que as proteínas, uma vez que os níveis de TBA-RS e de FOX hepáticos do GSA foi significativamente maior do que seus dois controles (GC e GCA), enquanto que a proteína carbonilada hepática do GSA foi significativamente superior apenas com o GC, e não com o GCS (Tabelas 12, 13 e 14; Figuras 5, 6 e 7)

## 5 CONCLUSÕES

1. Já foram realizados vários estudos que avaliaram a semente de abóbora e algumas doenças, porém este foi um dos primeiros estudos onde foi avaliada a semente de abóbora e o efeito do seu consumo sobre os danos oxidativos em lipídeos e proteínas no fígado dos animais;
2. Através da realização da composição centesimal e da determinação da composição de ácidos graxos da semente de abóbora (*Cucurbita pepo*) cultivada em Santo Amaro da Imperatriz – SC foi observado que esta apresentou concentrações altas de proteínas e lipídeos. Em relação aos ácidos graxos, houve predomínio do ácido graxo linoléico;
3. Através da análise do conteúdo de fibras alimentares foi observado que a semente de abóbora apresentou um alto conteúdo de fibras insolúveis, levando a um aumento do bolo fecal dos animais que consumiram a ração com semente de abóbora;
4. Através da análise do conteúdo de vitamina E foi observado que a semente de abóbora apresentou níveis elevados de vitamina E, sendo o  $\gamma$ - tocoferol o isômero predominante;
5. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o consumo de semente de abóbora aumentou oxidação hepática de lipídeos e de proteínas nos animais. O efeito pró-oxidante causado pelo consumo da semente neste grupo de animais pode ser sugerido pela presença de fitoestrógenos ou cucurbitacina na semente ou, ainda, de substâncias a serem investigadas;
6. Recomenda-se futuros estudos *in vivo* e *in vitro* para avaliar outros cultivares e outras espécies de semente de abóbora quanto aos parâmetros aqui estudados. Além disso, outros estudos em relação à semente de abóbora devem ser abordados, como composição de aminoácidos, fitoestrógenos e identificação de cucurbitacina presentes na semente de abóboras que possam elucidar os resultados deste trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Z.; REZNICK, A.; PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 357-363, 1994.

AL-ZUHAIR H. et al. Efficacy of simvastatin and pumpkin-seed oil in the management of dietary-induced hypercholesterolemia. **Pharmacological Research**. v. 35, n. 5, p. 403-8, 1997.

AL-ZUHAIR, H. et al. Pumpkin seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacological Research**. v.41, n.5, p. 555-63, 2000.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. Carotenóides. In.: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003. p. 3-44.

AMERICAN OIL CHEMISTS'SOCIETY. AOCS. **Official Methods and recommended practices of the AOCS**. 5 ed. American Oil Chemists'Society, Campaign, IL, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS -AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, 1997.

AWAD, A.B., FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**. v. 130, p. 2127-30, 2000.

BECKMAN, J.S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**. v.9, p. 836-844, 1996.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIANCHINI-PONTUSCHKA, R.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina E. In.: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003. p. 123-55.

BINGHAM, S.A.; ATKINSON, C.; LIGGINS, J.; BLUCK, L.; COWARD, A. Phyto-oestrogens: where are we now? **British Journal of Nutrition**. v.79, p.393-406, 1998.

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Annual Review of Biochemistry. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1, 9. ed, São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. et al. The european perspective on vitamina E: current knowledge and future research. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 76, p. 703-16, 2002.

BRIGELIUS-FLOHÉ R.;TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**. v. 13, p. 1145-55, 1999.

BRUBACHER, G.; MÜLLER-MULOT, W.; SOUTHGATE, DAT. **Methods for the determination of vitamins in food – recommended by Cost 91**. New York: Elsevier, 1985, p. 97-106.

BRUCE, B. et al. A diet high in whole ad unrefined foods favorably alters lipids, antioxidant defenses and colon function. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 19, n. 1, p. 61-7, 2000.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods of Enzymology**. v. 2, p. 302-9, 1978.

BURTON, G.W. et al. Human plasma and tissue alpha tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 67, p. 669-84, 1998.

CAI, H; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**. v. 87, p. 840–844, 2000.

CARAMEZ, S.M.B. **Caracterização físico-químico, análise sensorial e microscópica das sementes de *Cucurbita moschata*, maceradas quimicamente**. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos. Departamento de tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil, 2000. 57 p.

CARBIN, B.E. et al. Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols. **British Journal of Urology**. v. 66, n. 6, p. 639-41, 1990.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 72, p. 637S-46S, 2000.

CLEMENT, M., BOURRE, J.M. Graded dietary levels of RRR-gamma-tocopherols induce a marked increase in the concentrations of alpha and gamma tocopherol in nervous tissues, heart, liver and muscle of vitamin E deficient diets. **Biochemistry and Biophysics Acta**. v. 1334, p. 173-81, 1997.

COHN, W. Bioavailability of vitamin E. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 5, p. 80S-5S, 1997.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Manual para técnicos de biotério**. São Paulo: FINAP- Escola Paulista de Medicina. 2. ed. 1996, 259 p.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, D.;MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**. v. 9, n. 4, p. 169-76, 2003.

DAVIES, K,J,A. Protein Modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes. **Biochemistry Society Transactions**. v.21, p. 346-53, 1993.

DRAPPER, H.H.; BETTGER, W.J. Role of nutrients in the cause and prevention of oxygen radical pathology. **Advanced Experimental Medical Biology**. v. 366, p. 269-89, 1994.

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**. v. 80, p. 77S-112S, 1998.

DJOUSSE, L., et al. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the national heart, lung, and blood institute family heart study. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 612-619, 2001.

DUTRA-de-OLIVEIRA, J.E., MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998.

EL-ADAWY, T.; TAHA, K.M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin and paprika seed oils and flours. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 49, n. 3, p.1253-59, 2001.

EL-SOUKKARY, FA. Evaluation of pumpkin seed products for bread fortification. **Plant Foods Human Nutrition**. v. 56, n. 4, p. 365-84, 2001.

ESTERBAUER, H. et al. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 53, p. 314S-21S, 1991.

ESUOSO, K. et al., Chemical composition and potential of some underutilizes tropical biomass. I: fluted pumpkin. **Food Chemistry**. v. 61, n. 4, p. 187-92, 1998.

FAHIM, A.T. et al. Effect of pumpkin seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats. **Pharmacological Research**. v.31, n.1, p.73-9, 1995.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Review Nutrition**. v. 18, n.10, p. 872-78, 2002.

FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society**. v. 65, p. 899-910, 1894.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43.n 1, p. 61-8, 1997.

FRANK, J. et al. Dietary secoisolariciresinol diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats. **British Journal of Nutrition**. v. 92, p.169-76, 2004.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. v. 201, p.1203-09, 1998.

FRUHWIRTH, G.O. et al. Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils. **European Journal of Lipid Science Technology**. v. 105, p. 266- 74, 2003.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**. v.108, p.1912–1916, 2003.

GOVERS, M.J. et al. Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs. **Gut**. v. 45, p. 840-47, 1999.

HABER, F., WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London**. Series A, p. 147-332, 1934.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**. v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology**. 2. ed; Oxford: Clarendon Press, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Methods of Enzimology**. v. 186, n. 1, 1990.

HANDELMAN, G.J. et al. Human adipose alpha tocopherol and gamma tocopherol kinetics during and after 1 year of alpha tocopherol supplementation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 59, p.1025-32, 1994.

HERCBERG, S. et al. The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. **Nutrition**. v.14, n. 6, 1998.

HERMES-LIMA, M. WILLMORE, W.G. STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylene orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 19, n.3, p. 271-80, 1995.

HONG, J.H. et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**. v. 340, p. 107-15, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3. ed., v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: O Instituto, 1985. 533p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamento familiar 2002-2003**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. 276 p.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington DC., National Academic Press, 2001.1331p.

JIANG, Q. et al.  $\gamma$ -tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 714-22, 2001.

KAMAL-EDIN, A.; APPELQVIST, L.A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**. v. 31, p. 671-701, 1996.

KAMAL-EDIN, A. et al. Effects of dietary phenolics compounds on tocopherol, cholesterol and fatty acids in rats. **Lipids**. v. 35, p. 437-35, 2002.

KANG, M.H., KAWAI, Y., NAITO, M., OSAWA, T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Nutrition**. v.129, n.10, p.1885-90, 1999.

KITTS, D.D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 72, p. 423-24, 1994.

KREFT, I., STIBILJ, V., TRKOV, Z. Iodine and selenium contents in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil and oil cake. **European Food Research and Technology**. v. 215, p. 279-81, 2002.

KRIS-ETHERTON, P., et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**. v. 113, p. 71S-88S, 2002.

KURZER, M.S., XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**. v.17, p. 353-81, 1997.

LAZOS, E.S. Changes in pumpkin seed oil during heating. **Grasas y Aceites**. v.46, n. 4-5, p. 233-39, 1995.

LECHNER, M.; REITER, B.; LORBEER, E. Determination of tocopherols as sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. **Journal of Chromatography Analytical**. v. 857, p. 231-8, 1999.

LIMA, F.E.L. et al. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Revista de Nutrição**. v.13, n.2, p.73-80, 2000.

MAHMOUD, L.H.; BASIOUNY, S.O.; DAWOUD, H.A. Treatment of experimental heterophyiasis with two plant extracts, areca nut and pumpkin seed. **Journal of Egypt Society Parasitology**. v. 32, n. 2, p. 501-6, 2002.

MANSOUR, E.H. et al. Evaluation of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Kakai 35) as a new source of protein. **Acta Alimentaria**. v. 22, p. 3-13, 1993.

MANSOUR, E.H. et al. Pumpkin and canola seed protein and bread quality. **Acta Alimentaria**. v. 28, p. 59-70, 1999.

MAZUR, W. et al. Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoides coumestrol and lignans in food samples. **Annals of Biochemistry**. v. 233, p.169-80, 1996.

MAZUR, W.; ADLERCREUTZ, H. Naturally occurring oestrogens in food. **Pure and Applied Chemistry**. v.70, p. 1759-76, 1998.

MC CANCE, R.A., LAWRENCE, R.D. **The composition of foods**. Fifth revised and extended edition. The royal society of chemistry and ministry of agriculture, Fisheries and Food. United Kingdom, 1994. 462 p.

MC CORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine**. v. 108, p.652-59, 2000.

MEYDANI, M. et al. The effect of long term dietary supplementation with antioxidants. In: HARMAN, D. et al. (Ed.). Towards prolongation of the healthy life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 854. p. 78-91, 1998.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapeutic Research**.v. 9, p.159–68, 2005.

MURKOVIC, M. et al. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting processo for production of pumpkin seed oil (Part I: non-volatile compounds). **Food Chemistry**. v. 84, p. 359-65, 2004.

MURKOVIC, M et al. Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo L.*). **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v. 202, n. 4, p. 275-8, 1996.

MURKOVIC, M et al. Variability of fatty acids content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo L.*). **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v. 203, n. 4, p. 216-9, 1996.

NAJI, I.Z. On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging, and degenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 928, p. 187-9, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). **Dietary references intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids, DRIs**. Washington: National Academy Press; 2000. 509p.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, n. 4, p. 418-25, 2001.

ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens advantages and some possible mechanisms on antimutagenic action. **Mutation Research**. v. 386, n. 1, p. 39-67, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. In.: CARAMEZ, SMB. **Caracterização físico-químico, análise sensorial e microscópica das sementes de cucurbita moschata, maceradas quimicamente**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos. Departamento de tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil, 2000. 57 p.

PACKER, L. Nitric oxide. Part A: sources and detection of NO and NO synthase. **Methods in Enzymology**. v. 268, p. 331-40, 1996.

PACKER, L. Oxidant, antioxidant nutrients and the athlete. **Journal of Sports Science**. v. 15, p. 353-63, 1997.

- PHILLIPS, K.M., RUGGIO, D., KHORASSANI, A. Phytosterol Composition of Nuts and Seeds Commonly Consumed in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 9436-45, 2005.
- QUANHONG, L. et al. Study on the hypoglycemic action of pumpkin extract in diabet rat. **Acta Nutrimenta Sinica**. v. 25, n. 1, p. 34-6, 2003.
- QUEIROZ-NETO, A. et al. Toxicologic evaluation of acute and subacute oral administrations of cucurbita maxima seed extract to rats and swine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 43, p. 43-51, 1994.
- RASTOGI, T., et al. Diet and risk of ischemic heart disease in India. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, p. 582-92, 2004.
- RATNAYAKE, W.M.N. et al. Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 3, p. 232-40, 1992.
- REEVES, P.G. et al. AIN-93, purified diets for laboratory reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**. v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- REZNICK, A.Z., PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods of Enzymology**. v. 233, p. 357-63, 1994.
- RICE, C. A., RYMAL, K. S., CHAMBLISS, O. L., JOHNSON, F. A. Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacin of three *Cucumis sativus* cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 29, p. 194-6, 1981.
- RIOS, M.D.G.; PENTEADO, M.V.C. Vitamina C. In.: PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003. p. 201-25.
- SAGARA, Y.; DARGUSH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, J.; SCHUBERT, D.; AHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radical Biology Medicine**. v.24, p.1375-89, 1998.
- SARNI, R.S.; LEITE, H.P. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**. v. 129, p. 758s-767s, 1999.
- SICILIA, T. et al. Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 1181-88, 2003.
- SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In.: SIES, H. **Oxidative stress**. Florida: Academic Press, 1985. p. 1-10.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**. v. 91, p. 31s-39s, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. Review. **European Journal of Biochemistry**. Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SMIT, H.F. et al. Inhibition of T-lymphocyte proliferation by cucurbitacins from *Picrorhiza scrophulariaeflora*. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 1300-02, 2000.

SUPHAKARN, V.S. et al. The effect of pumpkin seeds on oxalocrystalluria and urinary composition of children in hyperendemic area. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 45, p. 115-21, 1987.

SUPHIPHAT, V. et al. The effect of pumpkin seeds snacks on inhibitors and promoter os urolithiasis in Thai adolescents. **Journal of Medical Association of Thailand**. v. 76, n. 9, p. 487-93, 1993.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.

TRABER, M.G. Vitamina E. In.: SHILS, M.E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1, 9 ed. São Paulo: Manole, 2003. 1026 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE –USDA. National Agriculture Library. <http://fnic.nal.usda.gov>. Acesso realizado em 12 de agosto de 2006.

VAN DAM, P.S. High rat food vitamin E content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 376, n. 3, p. 217-22, 1999.

WEST, IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabetes Medicine**. v. 17, n.3, p. 171-80, 2000.

YAMASHITA, K.; IKEDA, S.; OBAYASHI, M. Comparative effects of flaxseed and sesame seed on vitamin E and cholesterol levels in rats. **Lipids**. v. 38, n. 12, p. 1249-55, 2003.

YOUNIS, Y.M.H.; GHIRMAY, S.; AL-SHIHRY, S.S. African *Cucurbita pepo L.*: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. **Phytochemistry**. v. 54, p. 71-5, 2000.

ZAVA, D.T.; DUWE, G. Estrogenic and antiproliferative properties and other flavonoids in human breast cancer cells *in vivo*. **Nutrition Cancer**. v. 27, p. 31–40, 1997.

ZITTER, T.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. Minnesota: APS Press, 1998. 148 p.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.