



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Atividade Antioxidante, Polifenóis Totais, Carotenoides Totais, α - e β -
carotenos e Isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) em Cultivares de Abóbora
(*Cucurbita moschata*) Cruas e Cozidas**

Lara de Azevedo Sarmet Moreira Smiderle

Rio de Janeiro

2013

Lara de Azevedo Sarmet Moreira Smiderle

Atividade Antioxidante, Polifenóis Totais, Carotenoides Totais, α - e β -carotenos e Isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) em Cultivares de Abóbora (*Cucurbita moschata*) Cruas e Cozidas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Jaeger de Carvalho
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mirian Ribeiro Leite Moura

Rio de Janeiro

2013

S639a Smiderle, Lara de Azevedo Sarmet Moreira.

Atividade antioxidante, polifenóis totais, carotenoides totais, α - e β -carotenos e isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) em cultivares de abóbora (*Cucurbita moschata*) cruas e cozidas/ Lara de Azevedo Sarmet Moreira Smiderle; orientadora Lucia Maria Jaeger de Carvalho; co-orientadora Mirian Ribeiro Leite Moura. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

114f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. *Cucurbita moschata*. 2. Atividade antioxidante. 3. Carotenoides. 4. Cozimento. I. Carvalho, Lucia Maria Jaeger de. II. Moura, Mirian Ribeiro Leite. III. Título.

CDD 615.32

Lara de Azevedo Sarmet Moreira Smiderle

Atividade Antioxidante, Polifenóis Totais, Carotenoides Totais, α - e β -carotenos e Isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) em Cultivares de Abóbora (*Cucurbita moschata*) Cruas e Cozidas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 21 / 08 / 2013

Orientadores:

Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Prof^ª. Dr^ª. Mirian Ribeiro Leite Moura

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva –
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz – IFRJ

Prof^ª. Dr^ª. Gisela Maria Dellamora Ortiz –
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para sua realização, em especial, meus amados pais: José Abílio e Maria Helena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com sua infinita bondade, guiou minha caminhada.

Aos meus pais, por terem feito sempre tudo o que estava ao alcance para que eu fosse feliz; pelos incentivos e por serem exemplos de vida. AMO VOCÊS!

À minha irmã Clarice, por ser minha amiga mais especial e companheira sempre.

Ao meu namorado Marcelo, que trouxe tanta alegria e amor para minha vida. Obrigada por toda a força, paciência e carinho!

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Jaeger de Carvalho, pelo estímulo, paciência, confiança, lições, cobranças e contribuições importantes para o andamento do trabalho. Especialmente pela disponibilidade para ajudar todas as vezes que precisei! MUITO OBRIGADA!

À prof^ª. Dr^ª. Mirian Ribeiro Leite Moura, minha co-orientadora e primeira orientadora, por me introduzir na vida acadêmica, pela amizade e contribuições.

Ao grande amigo Flavio, por estar sempre disposto a ajudar com alegria nas análises que realizei e discutir os resultados obtidos; pelos ensinamentos do Excel (cálculos, gráficos, etc), Word (sumário, macros, “end+tab+del”, etc) e “Vision Lite” (apelidado de “Vision night”); e por todos os momentos de diversão no laboratório e fora dele, juntamente com a Biba e a linda Flavinha.

À querida Elen, pelas palavras sábias de sempre, festas surpresas e incentivo; a Patrícia Barros, por todos os ensinamentos na área de carotenoides, conversas e conselhos; a Ediane, por dividir esse projeto comigo e também momentos divertidos.

Aos alunos do LabTAIA Roberto, Gabriela, Déborah, Amanda, Danielle Leite, Daniele Osório e Joyce. Em especial a Pedro e Guilherme, por toda a ajuda na extração de carotenoides, cálculos de retenção e utilização do cromatógrafo, e Juliana e Isabella, pela colaboração nas análises de atividade antioxidante.

Aos amigos do LabCBrom: Isaias, Paula, especialmente Ângelo e Claudinha, por serem tão prestativos e estarem sempre disponíveis a me ajudar no que eu precisasse. Também ao Pedro, pela contribuição na realização da análise de Fenólicos Totais.

À prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes Giada, por sua contribuição tão valiosa na implementação do método de mensuração da atividade antioxidante Sistema β -caroteno/ ácido linoleico no laboratório e também por estar sempre disponível para tirar dúvidas e ajudar na avaliação dos resultados.

Ao Jancei, pela imensa contribuição na elaboração dos extratos e realização das análises de DPPH e por estar sempre disposto a colaborar, mesmo à distância.

Às professoras Gisela Maria Dellamora Ortiz e Mônica Freiman, que, ao fazerem parte da minha comissão de acompanhamento, contribuíram com correções e ensinamentos ao longo dessa jornada.

À EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, em especial, ao pesquisador José Luiz Viana de Carvalho, pela contribuição nos trâmites para a cessão das amostras de abóbora e insumos para a dissertação.

À pesquisadora Dr^a. Semiramis Ramalho Ramos, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, pela cessão das cultivares utilizadas no presente estudo

Ao Programa BioFORT, pelo apoio financeiro à execução da presente dissertação.

Aos meus queridos avós Altair, Nair e Jeanne, por todo o apoio, carinho e amor.

Aos meus tios que eu amo tanto e sempre torcem por mim, especialmente tios Marcio e Rosa, Célia e Gegê e meus dindos Arthemio e Margaret.

Aos meus primos tão queridos, especialmente Paulinha, pela amizade tão especial e carinho; Alvinho, por estar sempre presente em minha vida e por tantos encontros especiais no Fundão; Júlia, pelo companheirismo e incentivo; Thales e Luciana, que mesmo de tão longe sempre acompanharam minha caminhada e torceram por mim e Maitê, pelo interesse que sempre demonstrou na luta pelo meu sucesso.

Aos meus amigos especiais Pedro, Nathália, Lara Lis, Laís, Luísa, Luiz, Ane, Sarah, Júlia, Priscila e tantos outros, por estarem sempre ao meu lado.

Aos queridos tia Thalia, Renato, Maurício e Karol, que são tão especiais.

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por toda a ajuda prestada.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

“Não há nada mais trágico neste mundo do que saber o que é certo e não fazê-lo. Que tal mudarmos o mundo começando por nós mesmos?”

- Martin Luther King-

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

- Madre Teresa-

RESUMO

SMIDERLE, Lara de Azevedo Sarmet Moreira. **Atividade Antioxidante, Polifenóis Totais, Carotenoides Totais, α - e β -carotenos e Isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) em Cultivares de Abóbora (*Cucurbita moschata*) Cruas e Cozidas.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

A presente dissertação teve como objetivo principal avaliar a atividade antioxidante de duas cultivares de abóbora *Cucurbita moschata* crua e após cozimento em imersão em água e no vapor. A atividade antioxidante foi determinada por espectrofotometria na faixa do UV/visível pelos métodos ABTS, DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico, teores de polifenóis totais, bem como os teores de carotenoides totais. O α - e o β -caroteno e os isômeros *cis* e *trans* foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados do estudo mostraram que o cozimento afetou o conteúdo determinado de compostos bioativos (aumentou disponibilidade de carotenoides e diminuiu compostos fenólicos) e a atividade antioxidante (exceto pelo método ABTS, em que não houve diferença significativa entre as preparações). A abóbora 1 apresentou elevados teores de carotenoides totais (589,12-655,30 $\mu\text{g/g}$), α -caroteno (207,09-229,97 $\mu\text{g/g}$) e todo-*E*- β -caroteno (317,12-339,61 $\mu\text{g/g}$), provavelmente devido ao estágio de maturação mais avançado. Em comparação, a abóbora 2 apresentou valores bem inferiores. Após o cozimento, houve aumento de todos os carotenoides avaliados em ambas as abóboras, sendo o cozimento no vapor o que proporcionou maiores percentuais de retenção. Entretanto, as amostras não mostraram o mesmo comportamento nas diferentes metodologias utilizadas para a mensuração da atividade antioxidante. Isso pode ser explicado pelas alterações provocadas pelo cozimento, seja degradando alguns compostos (como fenólicos) ou aumentando a disponibilidade de outros (como carotenoides). A atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH foi bem reduzida quando comparada à literatura e com os outros métodos avaliados, porém as amostras cozidas apresentaram maior atividade do que as cruas. O método ABTS revelou resultados mais elevados do que muitos apresentados na literatura para vegetais. A abóbora 2 apresentou maior atividade por esse método. No sistema β -caroteno/ ácido linoleico a abóbora 1 cozida e a 2 crua foram as que apresentaram maior atividade.

Palavras-chave: *C. moschata*, atividade antioxidante, carotenoides, cozimento

ABSTRACT

SMIDERLE, Lara de Azevedo Sarmet Moreira. **Antioxidant activity, total polyphenols, total carotenoids, α - and β -carotene and isomers *trans* (E) and *cis* (Z) in raw and cooked pumpkin cultivars (*Cucurbita moschata*).** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

The present work aimed to evaluate the antioxidant activity of two varieties of *Cucurbita moschata*. Analyses were carried out in raw and cooked samples, using water immersion and steam cooking. The antioxidant activity was determined by UV/visible spectrophotometry by ABTS, DPPH, β -carotene/ linoleic acid system, total polyphenol content, as well as the levels of total carotenoids. The α - and β -carotene and *cis* and *trans* isomers were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results of the study showed that cooking affected the specific content of bioactive compounds (increased the availability of carotenoids and decreased the phenolic compounds) and antioxidant activity (except for the ABTS method, in which no significant difference between preparations was detected). Pumpkin 1 showed high levels of total carotenoids (589,12-655,30 $\mu\text{g/g}$), α -carotene (207,09-229,97 $\mu\text{g/g}$) and all-*E*- β -carotene (317,12-339,61 $\mu\text{g/g}$), probably due to a more advanced stage of maturation. In comparison, values for pumpkin 2 were much lower. After cooking, there was an increase of all carotenoids evaluated in both pumpkins, and steam cooking resulted in the highest percentages of retention. However, the samples did not show the same behavior in different methodologies used to measure the antioxidant activity. This can be explained by changes caused by cooking either by degrading certain compounds (such as phenols) or increasing the availability of others (such as carotenoids). Antioxidant activity by DPPH was greatly reduced when compared with the literature and also with the other methods, but the cooked samples showed higher activity than the raw ones. The ABTS assay showed higher antioxidant activity than results reported in the literature for many vegetables. Pumpkin 2 showed higher activity by this method. In the β -carotene / linoleic acid system cooked pumpkin 1 cooked and raw pumpkin 2 showed the highest activities.

Palavras-chave: *C. moschata*, antioxidant activity, carotenoids, cooking

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

abs - absorvância

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

BHA- butil-hidroxi-anisol

BHT- butil-hidroxi-tolueno

C₃ - Três unidades de carbono

C₅ – Cinco unidades de carbono

C₆ - Seis unidades de carbono

C₄₀ – Quarenta unidades de carbono

CG – Cromatografia a gás

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

C. moschata - *Cucurbita moschata*

cv. - cultivar

DP - desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG – equivalente de ácido gálico

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

IC₅₀ - quantidade de antioxidante requerida para obter-se 50% de inibição do radical DPPH

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

M- molar

mL - mililitro

mg - miligrama

nm – nanômetro

POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares

ppm - partes por milhão (mg/L)

PRM - produtos da reação de Maillard

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – rotações por minuto

TBHQ - butil-hidroxiquinona

VCT - Valor Calórico Total

μL - microlitro

μg - micrograma

% seq. – percentual de sequestro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da Vitamina A (retinol).....	22
Figura 2: Esquemática dos requisitos para atividade provitamina A	25
Figura 3: Estruturas dos principais carotenoides importantes para a saúde.....	25
Figura 4: Formação de β -ionona a partir do β -caroteno.....	26
Figura 5: Isômeros geométricos comuns do β -caroteno.....	27
Figura 6: Papel dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas.	29
Figura 7: Provável distribuição pré-colombiana das cinco espécies cultivadas de <i>Cucurbita</i>	33
Figura 8: Diferentes formas assumidas pela <i>C. moschata</i> Duchense cv. Cehulaca.	35
Figura 9: Variação apresentada pelos frutos de abóbora cv. Maranhão, com relação ao tamanho, formato, diâmetro da cavidade interna, espessura e coloração de polpa dos frutos avaliados.	36
Figura 10: Representação da estrutura química de alguns flavonoides	39
Figura 11: Representação esquemática da estrutura dos ácidos 3-hidroxicinâmico e 3-hidroxibenzoico	39
Figura 12: Representação esquemática da estrutura química do radical DPPH e sua estabilização.....	41
Figura 13: Representação esquemática da estrutura química do radical ABTS ⁺	42
Figura 14: Imagem fotográfica da solução do radical ABTS ⁺	42
Figura 15: Representação da estrutura química do ácido linoleico.....	43
Figura 16: Imagem fotográfica das abóboras recebidas da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, Aracajú.....	46
Figura 17: Imagens fotográficas das abóboras utilizadas para realização das análises. A) Abóbora 1 (código P333 F2 da Embrapa); B) Abóbora 2 (código P261 F2 da Embrapa).....	47
Figura 18: Imagens fotográficas de procedimentos gerais realizados com as abóboras, como: pesagem, abertura das abóboras, corte da polpa e cozimento sob imersão em água.....	48
Figura 19: Perfil cromatográfico e espectros de absorção obtidos da mistura multipadrões ..	54
Figura 20: Representação da estrutura química do ácido gálico	56
Figura 21: Imagem fotográfica ilustrativa da coloração do reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> frente a diferentes concentrações do padrão ácido gálico na análise de fenólicos totais.....	56
Figura 22: Imagem fotográfica da solução de DPPH com concentrações diferentes de solução de ácido gálico.	58
Figura 23: Representação da estrutura química do trolox.....	59

Figura 24: Imagem fotográfica da solução do sistema β -caroteno/ ácido linoleico.....	60
Figura 25: Cromatogramas das preparações da polpa da abóbora <i>C. moschata</i> 1.....	70
Figura 26: Cromatogramas das preparações da polpa da abóbora <i>C. moschata</i> 2.....	71
Figura 27: Curva padrão de ácido gálico no ensaio para quantificação de fenólicos totais....	79
Figura 28: Curva padrão de ácido gálico frente ao radical livre DPPH:	82
Figura 29: Estabilidade do radical ABTS ⁺ em função do tempo, a 734 nm.....	85
Figura 30: Imagem fotográfica da solução do radical ABTS ⁺ na presença de diferentes concentrações do padrão Trolox. A concentração de trolox nos tubos aumenta da esquerda para a direita, sendo que o último tubo (da direita) contém apenas etanol (branco).....	85
Figura 31: Curvas padrão de trolox frente ao ABTS nos três ensaios realizados.	86
Figura 32: Imagem fotográfica da descoloração do radical ABTS ⁺ utilizando as preparações da abóbora 1, cada uma em três diferentes concentrações	86
Figura 33: Imagem fotográfica da descoloração do radical ABTS ⁺ utilizando as preparações da abóbora 2, cada uma em três diferentes concentrações	87
Figura 34: Cinética do potencial antioxidante dos extratos em metanol das abóboras 1 e 2 (a 0,01 g/mL) e as preparações cruas (1c e 2c), cozidas em imersão (1i e 2i) e cozidas no vapor (1v e 2v) em diferentes volumes de solução (25, 100 e 400 μ L); diferentes volumes do padrão trolox: 25 μ L (T.25), 100 μ L (T.100), 200 μ L (T.200) e 400 μ L (T.400) a 0,2 mg/mL e o controle (CONT.).	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição do gradiente da fase móvel utilizada nas análises.....	53
Quadro 2: Valores de composição centesimal (g/100g), fibras alimentares totais (g/100g) e VCT encontrados na literatura para a abóbora <i>C. moschata</i> (crua).....	64
Quadro 3: Carotenoides totais, α -caroteno, β -caroteno e isômeros 13- <i>cis</i> e 9- <i>cis</i> ($\mu\text{g/g}$), segundo a literatura, em abóboras <i>C. moschata</i> em diferentes preparações e variedades.....	73
Quadro 4: Fenólicos totais (em mg de ácido gálico/ g amostra seca) reportados na literatura em vegetais crus e cozidos.....	81
Quadro 5: Atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS de diferentes vegetais	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores referentes à pesagem das abóboras inteiras e às medições do comprimento e da largura.	61
Tabela 2: Composição centesimal (base úmida), teor de fibras alimentares totais e valor calórico total (VCT) realizadas em triplicata nos grupos de preparações das abóboras.	63
Tabela 3: Sólidos solúveis, expressos em °Brix, das preparações das abóboras 1 e 2.	67
Tabela 4: Carotenoides totais, α -caroteno e isômeros do β -caroteno (todo- <i>trans</i> , 13- <i>cis</i> e 9- <i>cis</i>) em $\mu\text{g/g}$ das abóboras 1 e 2.	72
Tabela 5: Percentual de retenção real de carotenoides totais, α - e todo- <i>E</i> - β -caroteno (%) das amostras de <i>C. moschata</i> cozidas por imersão em água e no vapor.	78
Tabela 6: Conteúdo de fenólicos totais das abóboras 1 e 2 e preparações em mg ácido gálico/g de amostra seca.	80
Tabela 7: Capacidade antioxidante dos extratos metanólicos (na concentração de 0,01 g/mL) das abóboras 1 e 2 (cruas, cozidas em imersão e no vapor) no ensaio DPPH.	83
Tabela 8: Capacidade antioxidante das diferentes concentrações de ácido gálico (em metanol) no ensaio DPPH.	83
Tabela 9: Capacidade antioxidante das abóboras 1 e 2 cruas e nas diferentes preparações, frente ao trolox, no ensaio ABTS (base seca).	87
Tabela 10: Atividade antioxidante (porcentagem de inibição da oxidação) de diferentes volumes dos extratos das abóboras 1 e 2 cruas e cozidas (em imersão e no vapor) e do padrão trolox (em metanol) pelo método sistema β -caroteno/ ácido linoleico.	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Vitamina A	22
2.1.1	Absorção.....	22
2.2	Carotenoides	23
2.2.1	Carotenoides provitamina A.....	25
2.2.2	Importância para a saúde humana	27
2.2.2.1	Benefícios e riscos da ingestão de β - caroteno.....	29
2.2.3	Principais fontes de carotenoides	31
2.3	Abóbora	31
2.3.1	Origem, <i>habitat</i> , distribuição e consumo.....	32
2.3.2	Atividade biológica	33
2.3.3	Carotenoides e composição de abóboras	34
2.3.4	Morfologia das abóboras	35
2.4	Antioxidantes em alimentos e na saúde humana.....	36
2.4.1	Substâncias fenólicas	37
2.4.1.1	Flavonoides	38
2.4.1.2	Não-flavonoides	39
2.4.1.3	Determinação de polifenóis totais.....	40
2.4.2	Métodos de mensuração da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	40
2.4.2.1	Ensaio do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).....	40
2.4.2.2	Método da captura do radical livre ABTS ⁺	41
2.4.2.3	Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	42
2.4.3	Consequências do processamento dos alimentos na atividade antioxidante e teor de carotenoides.....	43
3	JUSTIFICATIVA.....	44

4	OBJETIVOS.....	45
4.1	Objetivo Geral	45
4.2	Objetivos Específicos	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1	Material.....	46
5.1.1	Abóboras.....	46
5.1.2	Reagentes e produtos químicos	47
5.2	Métodos	47
5.2.1	Medição de dimensões e pesagem das abóboras	47
5.2.2	Abertura, higienização, corte e elaboração das preparações das abóboras	47
5.2.3	Preparações com abóbora	48
5.2.4	Análises físicas, químicas e instrumentais	49
5.2.4.1	Determinação da composição centesimal	49
a)	Umidade.....	49
b)	Lipídios ou extrato etéreo	49
c)	Determinação de cinzas	49
d)	Determinação de proteínas (Nitrogênio total)	50
e)	Carboidratos (NIFEXT).....	50
5.2.4.2	Determinação de fibras alimentares totais	50
5.2.4.3	Valor calórico total (VCT).....	50
5.2.4.4	Sólidos solúveis da polpa	51
5.2.5	Carotenoides totais	51
5.2.6	α - e β -caroteno e isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	52
5.2.6.1	Condições cromatográficas	53
5.2.6.2	Mistura padrão de carotenoides e curvas de calibração	53
5.2.6.3	Identificação e quantificação dos carotenoides nas amostras	54

5.2.6.4	Determinação de percentual de retenção real (%RR) de carotenoides totais, α e β -caroteno	55
5.2.7	Liofilização das amostras	55
5.2.8	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	55
5.2.8.1	Obtenção dos extratos aquosos das amostras de abóboras liofilizadas	55
5.2.8.2	Ensaio de quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos	55
5.2.9	Determinação da atividade antioxidante total	56
5.2.9.1	Obtenção dos extratos metanólicos das amostras de abóboras liofilizadas	56
5.2.9.2	Ensaio de determinação da atividade antioxidante	57
a)	Método DPPH	57
b)	Método ABTS	58
c)	Sistema β -caroteno/ ácido linoléico	59
5.2.10	Delineamento dos experimentos	60
5.2.11	Análise estatística dos resultados	60
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	Medição de dimensões e pesagem das abóboras	61
6.2	Análises físicas, químicas e instrumentais	62
6.2.1	Determinação da composição centesimal, fibras alimentares totais e valor calórico total (VCT)	62
6.2.2	Sólidos solúveis da polpa	67
6.2.3	Carotenoides totais, α -caroteno e isômeros <i>trans</i> (E) e <i>cis</i> (Z) do β -caroteno ...	68
6.2.4	Retenção real (%RR) de carotenoides totais, α - e β -carotenos	77
6.2.5	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais	78
6.2.6	Atividade antioxidante	82
6.2.6.1	Método DPPH	82
6.2.6.2	Método da captura do radical livre ABTS ⁺	85
6.2.6.3	Sistema β -caroteno/ ácido linoleico	89

6.2.6.4	Avaliação da relação entre os métodos de avaliação da atividade antioxidante e os teores de carotenoides e polifenóis	94
7	CONCLUSÕES.....	97
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1 INTRODUÇÃO

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, comumente uma grande parcela da população sofre os efeitos da desnutrição¹. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil ainda não conseguiu acabar com a desnutrição de crianças até 5 anos, entretanto o problema está diminuindo cada vez mais no país (IBGE, 2010).

A nível nacional mas, principalmente, no norte e nordeste do Brasil, regiões consideradas de maior risco no país, há programas do governo visando à suplementação de ferro e vitamina A para crianças e gestantes, com base na identidade cultural e alimentar das diversas regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública que afeta principalmente crianças e mulheres carentes. Na tentativa de reverter esse quadro, o interesse por alimentos com altos conteúdos de carotenoides com atividade provitamina A aumentou substancialmente nos últimos anos. Abóboras do gênero *Cucurbita* são amplamente cultivadas no Brasil, principalmente nos estados da região nordeste, e possuem grande quantidade de carotenoides com atividade provitamina A (ARIMA, RODRIGUEZ-AMAYA, 1988).

Além disso, com o envelhecimento da população e, como consequência, o aumento do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres e doenças neurodegenerativas, também tem aumentado a demanda por alimentos com atividade antioxidante. As abóboras da espécie *Cucurbita moschata* são fontes de carotenoides com atividade antioxidante e, também, compostos fenólicos, apresentando, ainda, elevados teores de vitamina C.

Segundo a tabela NutritionData (2011), uma porção de 140 g de abóbora apresenta 49% do valor diário recomendado de vitamina C, que é de 45 mg para adultos (ANVISA, 2005).

A abóbora já integra muitos pratos da culinária brasileira. Sua polpa é consumida cozida e também em preparações como doces, tortas, sopas e pães. Suas sementes geralmente são consumidas torradas e possuem alto teor nutritivo (JACOBO-VALENZUELA *et al.*, 2011).

¹ Apresenta desnutrição o organismo do indivíduo que manifesta sinais clínicos provenientes da inadequação quantitativa (energia) ou qualitativa (nutrientes) da dieta ou quando há doenças que comprometam o aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (MONTEIRO, 1995).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vitamina A

As vitaminas em geral são substâncias orgânicas que estão presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades, mas são indispensáveis ao funcionamento do organismo, atuando como cofatores. A maioria dos organismos animais é incapaz de sintetizá-las por via anabólica, precisando ser incluídas na dieta. Em geral, são necessárias apenas em quantidades ínfimas, mas pode haver variação em função da idade, sexo, estado fisiológico e atividade física do indivíduo. A demanda por essa vitamina aumenta durante os períodos de crescimento, gestação e lactação, nas condições de trabalho intenso e ocorrência de determinadas doenças (geralmente infecciosas) (PAIXÃO, STAMFORD, 2004).

A vitamina A, ou retinol (figura 1), é lipossolúvel e armazenada no fígado. Sua deficiência ocorre apenas após falta prolongada de uma fonte adequada na dieta. O primeiro sintoma de sua deficiência é a cegueira noturna, seguida por queratinização dos tecidos epiteliais dos olhos (xeroftalmia) e redução da secreção mucosa. Há também aumento na susceptibilidade a infecções (UNDERWOOD, 1994).

Estudos recentes reportam que a deficiência de vitamina A subclínica (quando estão ausentes os sinais de xeroftalmia) intensifica a gravidade de enfermidades como diarreia e outros processos infecciosos, podendo provocar quadros de imunodeficiência de origem exclusivamente nutricional (RAMALHO, PADILHA, SAUNDERS, 2008).

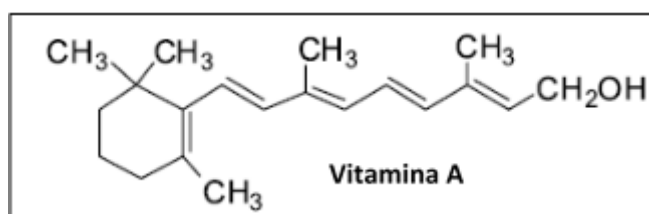


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da Vitamina A (retinol). A molécula possui um fragmento de anel β-ionona na sua estrutura, que interage com o receptor de ácido retinóico (adaptado de JANAKIRAM *et al.*, 2008).

2.1.1 Absorção

Como tratam-se de compostos lipossolúveis, a vitamina A (retinol *todo-trans*) e seus precursores carotenoides são digeridos e absorvidos por mecanismos comuns aos lipídeos, requerendo, portanto, a presença de gordura. Aproximadamente 5 a 10 g de gordura na refeição são suficientes para promover a absorção desses compostos. Os ésteres de vitamina A pré-formados são hidrolisados a retinol por enzimas pancreáticas e da borda em escova do intestino

delgado, misturados com micelas e absorvidos por difusão. Há também proteínas carreadoras que facilitam a captação (SEMBA, BLOEM, 2008).

2.2 Carotenoides

De todos os pigmentos naturais, os carotenoides são provavelmente os de maior ocorrência, podendo ser encontrados em animais, vegetais e micro-organismos. Os carotenoides são pigmentos cuja estrutura mais frequente é a do tipo tetraterpenoide C₄₀, formados a partir da união de oito unidades isoprenoides C₅. Devido à presença de múltiplas ligações duplas conjugadas, são altamente coloridos e lipofílicos, apresentando uma variedade de cores desde o amarelo até o vermelho intenso (CARDOSO, 1997; FONTANA *et al.*, 2000). Entretanto, há casos em que a clorofila, pigmento de cor verde e dominante, mascara a cor dos carotenoides em alguns tecidos vegetais. Mas, quando ocorre a degradação da clorofila, torna-se possível a visualização das colorações características dos carotenoides. As maiores causas de destruição dos carotenoides durante processamento e armazenamento dos alimentos são oxidações enzimáticas e não enzimáticas. Isso se dá devido à natureza insaturada dos carotenoides (DUTTA, CHAUDHURI, CHAKRABORTY, 2005).

Embora os carotenoides sejam muito abundantes também em animais e responsáveis pela coloração apresentada por muitos insetos, pássaros, peixes e crustáceos, apenas plantas e micro-organismos são capazes de sintetizá-los. Nos vegetais, esses microcomponentes são constituintes da maquinaria fotossintética e protegem contra danos causados pela luz. Como os animais são incapazes de produzi-los, as principais fontes de carotenoides na alimentação humana são as frutas e os vegetais (CARDOSO, 1997; RAO, RAO, 2007).

A deficiência de vitamina A, ainda hoje, assume graves proporções no contexto de saúde pública em todo o mundo e, quando prolongada, pode causar alterações no revestimento ocular, levando a um quadro de cegueira irreversível (xerofalmia e ceratomalácia). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2003), aproximadamente 500 milhões de pessoas sofrem das consequências da deficiência de vitamina A. Com isso, o interesse por matérias primas de origem vegetal ricas em carotenoides com atividade provitamina A tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, visto que estes micronutrientes podem suprir deficiências nutricionais das populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (MARTINS *et al.*, 2007).

Segundo Fontana e colaboradores (2000), já foram reportados e caracterizados mais de 600 variantes estruturais dos carotenoides, os quais são produzidos a partir de bactérias, algas, fungos e plantas superiores. Os carotenoides provenientes de vegetais contribuem com cerca de

68% da vitamina A da dieta em termos mundiais e com 82% nos países desenvolvidos (SOUZA, BOAS, 2002). Os principais carotenoides encontrados nos alimentos são: β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína e violaxantina. Esses carotenoides são também os mais comumente encontrados no plasma humano, exceto violaxantina. Por isso, juntamente com a zeaxantina, são os mais estudados em termos de efeitos de proteção à saúde. Cerca de 90% dos carotenoides na dieta e corpo humano são representados por β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Um benefício das provitaminas A é que somente são convertidas em vitamina A quando o organismo necessita, evitando, portanto, seu acúmulo. Por outro lado, vários fatores influenciam a sua absorção e utilização, como o tipo e a forma física dos carotenoides na dieta, a ingestão de gorduras, vitamina E, fibras e a existência de certas doenças e infecções causadas por parasitas. Palace e colaboradores (1999) reportaram que apenas alguns dos carotenoides são compostos provitamina A e outros têm pouca ou nenhuma atividade de vitamina A. Segundo Veronezi e Jorge (2011), as frutas e demais vegetais *in natura*, como, por exemplo, as abóboras (família Cucurbitaceae), são as principais fontes de carotenoides e as mais importantes para a saúde humana.

O esqueleto básico da estrutura desses pigmentos pode ser modificado de várias maneiras, incluindo ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de funções oxigenadas, rearranjo, diminuição de cadeia, ou combinações destes. Os carotenoides hidrocarbonetos são conhecidos como carotenos, enquanto os derivados oxigenados (através de reações como hidroxilação e epoxidação) como xantofilas (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004).

Os carotenoides podem ser quantificados e identificados nos alimentos através de várias técnicas instrumentais, dentre as quais a espectrofotometria na região visível do espectro, a espectrometria de massas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia a gás (CG) (VERONEZI, JORGE, 2011).

Na natureza, os carotenoides encontram-se protegidos nos tecidos vegetais. Com o corte, a trituração, a fragmentação e o despulpamento dos frutos e vegetais, há aumento da exposição ao oxigênio, promovendo o encontro de enzimas que catalisam a oxidação com os carotenoides. O congelamento, especialmente quando se dá de maneira rápida, geralmente auxilia na sua preservação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

2.2.1 Carotenoides provitamina A

São carotenoides provitamina A: β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina. O β -caroteno é o mais potente como provitamina A, já que a estrutura da vitamina A (retinol) é a metade da molécula do β -caroteno, com uma molécula de água acrescida à porção final da cadeia poliênica. Por isso, atribui-se 100% de atividade a este carotenoide. Na figura 2, pode-se observar a estrutura do β -caroteno. Para um carotenoide possuir atividade pró-vitáminica A, deve apresentar, no mínimo, um fragmento de anel β -ionona não substituído e uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos. Portanto, o α -caroteno e a β -criptoxantina apresentam aproximadamente 50% da atividade do β -caroteno, enquanto a luteína, a zeaxantina e o licopeno não possuem essa atividade (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008). Pode-se observar também as estruturas dos carotenoides citados na figura 3.

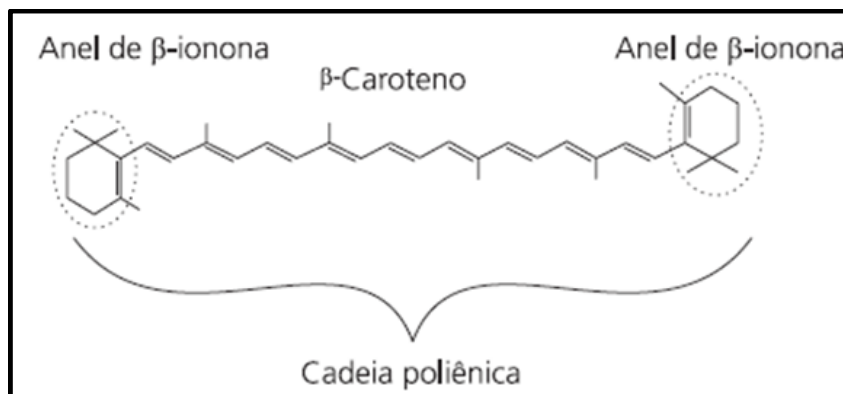


Figura 2: Esquematização dos requisitos para atividade provitamina A (AMBRÓSIO, CAMPOS, FARO, 2006).

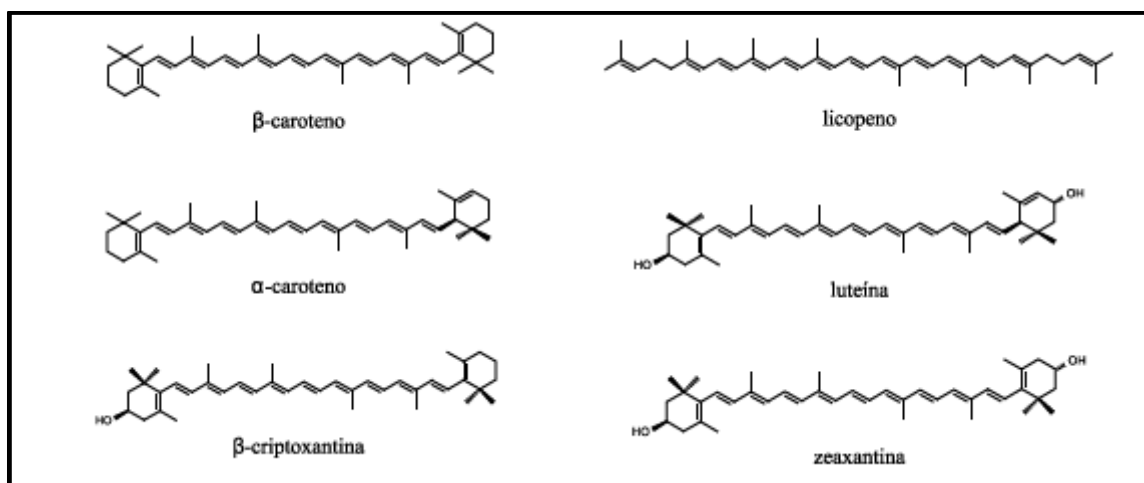


Figura 3: Estruturas dos principais carotenoides importantes para a saúde (Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

A conversão dos carotenoides a vitamina A ocorre naturalmente no fígado. Devido à simetria apresentada pela molécula de β -caroteno, sugere-se que a clivagem ocorre na posição central da molécula, produzindo então duas de vitamina A. No entanto, até o momento, essa teoria não está totalmente esclarecida. Como a clivagem ocorre *in vivo*, as tentativas de entender esse mecanismo são especulativas, tornando as condições de reação muito difíceis de serem controladas. A clivagem central do β -caroteno pela enzima 15,15'-dioxigenase está comprovada *in vivo* e *in vitro*. Porém, alternativamente, para alguns autores, o mecanismo de clivagem na posição 8' também é possível de ocorrer (UENOJO, MARÓSTICA JR., PASTORE, 2005).

Além disso, de acordo com Uenojo, Maróstica Jr. e Pastore (2007), o β -caroteno também pode ser convertido a β -ionona por meio de apenas uma clivagem, que pode ser observada na figura 4. Trata-se de um composto volátil derivado de carotenoides, que, nas plantas, contribui para afastar fungos e herbívoros e atrair agentes polinizadores.

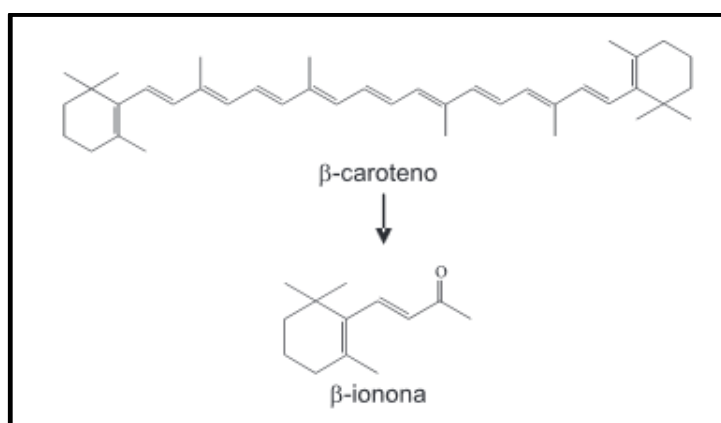


Figura 4: Formação de β -ionona a partir do β -caroteno (UENOJO, MARÓSTICA JR., PASTORE, 2007).

Os isômeros *Z* (*cis*) de provitaminas A são conhecidos por possuírem menor atividade de vitamina A do que os isômeros *E* (*trans*) correspondentes (estruturas apresentadas na figura 5). O β -caroteno existe naturalmente na forma *todo-trans*, que é termodinamicamente mais estável e menos solúvel. Além disso, descobriu-se que o *todo-E*- β -caroteno era absorvido preferencialmente ao 9-*Z*- β -caroteno, em humanos (BEN-AMOTZ, LEVY, 1996; STAHL *et al.*, 1995). Segundo Gazino e colaboradores (1995), o organismo é capaz de diferenciar claramente entre os isômeros *todo-E*- e 9-*Z*- do β -caroteno e, provavelmente, é o que ocorre no momento da absorção intestinal, do metabolismo em produtos de vitamina A, da secreção pelo fígado ou no processo de captação por tecidos periféricos e armazenamento.

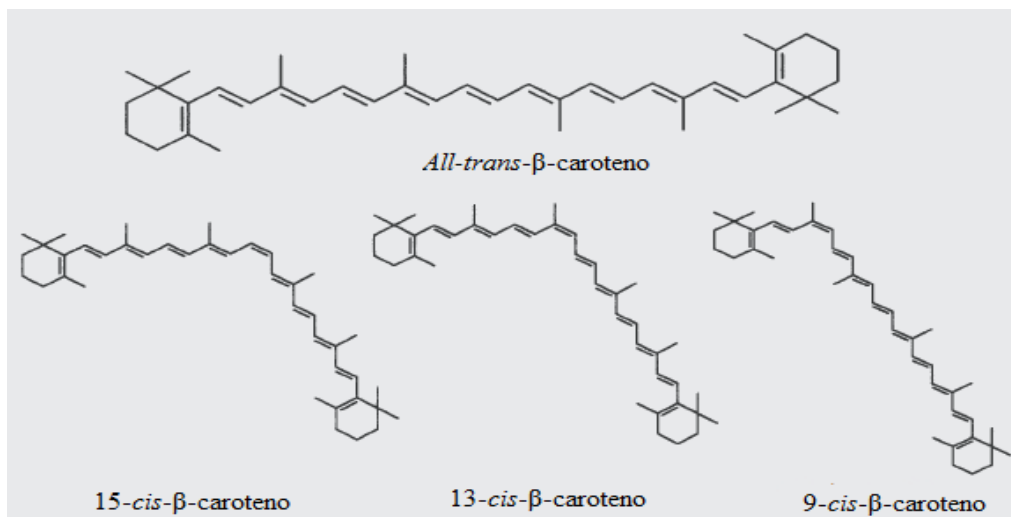


Figura 5: Isômeros geométricos comuns do β -caroteno (Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004).

A exposição ao calor, ácidos, luz, oxigênio e enzimas, como lipoxigenases, pode provocar alterações nas estruturas dos carotenoides, resultando na formação de isômeros *cis*, epóxidos, diminuição da cor, perda de atividade provitamina A e quebra da cadeia com formação de apocarotenoides (carotenoides com menos de 40 átomos de carbono). Como o isômero *cis* tem menor atividade provitamina A que a forma *trans*, é importante evitar a formação do mesmo durante o processamento de alimentos (COSTA, ORTEGA-FLORES, PENTEADO, 2002).

2.2.2 Importância para a saúde humana

Nos animais, a concentração de carotenoides em determinados tecidos, como pelos, plumas e carapaça, além da proteção antioxidante, integra a complexa rede de sinais de comunicação envolvidos na atração, advertência e camuflagem. A vitamina A ou retinol está envolvida nos processos da visão, reprodução e desenvolvimento normal da pele (FONTANA *et al.*, 2000).

Segundo Paiva e Russel (1999), estudos clínicos usando carotenoides apresentados na literatura podem ser divididos em três grupos:

- estudos que fazem associações entre a capacidade antioxidante do sangue ou tecido com os níveis de carotenoides na dieta ou sangue,
- estudos observacionais e epidemiológicos prospectivos e
- ensaios de intervenção.

Os principais benefícios à saúde atribuídos aos carotenoides são devido, principalmente, à atividade provitamina A e à atividade antioxidante que podem apresentar, sendo que as

propriedades antioxidantes dos carotenoides têm sido sugeridas como sendo o principal mecanismo pelo qual proporcionam seus efeitos benéficos. Vários experimentos *in vitro*, em animais e humanos, têm demonstrado as propriedades antioxidantes de carotenoides como o β -caroteno e o licopeno (RAO, RAO, 2007). A astaxantina, por exemplo, tem capacidade 250 vezes superior ao α -tocoferol em combater radicais livres (espécies reativas de oxigênio). Medidas via foto-emissão indicam que a capacidade de sequestro de oxigênio singlete por parte de carotenos e xantofilas é máxima para o licopeno, alta para astaxantina, intermediária para β -caroteno e bixina e menor para luteína e crocina (FONTANA *et al.*, 2000).

Dos mais de 600 carotenoides que já foram identificados na natureza, apenas cerca de 40 estão presentes na alimentação humana típica. Desses 40, apenas 20 carotenoides foram identificados no sangue e tecidos humanos (RAO, RAO, 2007). Os seis carotenoides mais pesquisados por seus envolvimento na saúde humana são o β -caroteno (β,β -caroteno), α -caroteno (β,ϵ -caroteno), β -criptoxantina (β,β -caroten-3-ol), licopeno (ψ,ψ -caroteno), luteína (β,ϵ - caroteno-3,3'-diol) e zeaxantina (β,β - caroteno-3,3'-diol) (EPLER, ZEIGLER, CRAFT, 1993).

De acordo com estudos epidemiológicos, há uma relação positiva entre altas ingestões e concentrações de carotenoides nos tecidos e baixo risco de doenças crônicas (ELLIOTT, 2005; RAO, RAO, 2007).

Vários efeitos promotores da saúde têm sido atribuídos aos carotenoides, tais como: melhoria da resposta imunológica contra infecções, proteção da mucosa gástrica contra úlceras e redução do risco de desenvolver doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração muscular relacionada à idade e catarata. Além disso, os carotenoides também foram identificados como potenciais inibidores da doença de Alzheimer (BAKÓ, DELI, TÓTH, 2002; DUTTA, CHAUDHURI, CHAKRABORTY, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008). Essas atividades fisiológicas apresentadas não possuem relação com a atividade vitamínica A e têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, especificamente à capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (PALOZZA, KRINSKY, 1992). As principais ações biológicas dos carotenoides estão apresentadas na figura 6.

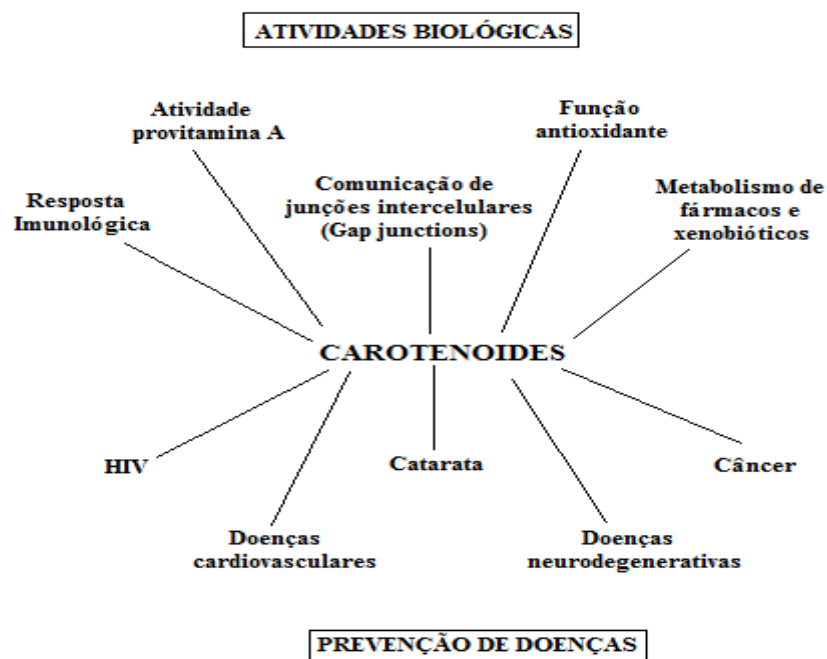


Figura 6: Papel dos carotenoides na prevenção de doenças crônicas (adaptado de Rao, Rao, 2007).

Vários mecanismos de ação foram relatados para a ação dos carotenoides contra as doenças crônicas, tais como a modulação do metabolismo de substâncias cancerígenas, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular e estímulo à comunicação intercelular (*gap junction*). Além disso, como os carotenoides também estão presentes no meio intracelular, podem ainda exercer os seguintes efeitos: regulação do crescimento celular, modulação da expressão de genes, melhora do sistema imunológico, modulação das enzimas de metabolização de drogas de fase I e II e inibição da adesão de monócitos e ativação plaquetária. Além disso, carotenoides como α - e β -carotenos e β -criptoxantina têm a vantagem adicional de serem capazes de se converterem a vitamina A e, dessa forma, prevenir doenças (ASTORG, 1997; HANDELMAN, 2001; DUTTA, CHAUDHURI, CHAKRABORTY, 2005; RAO, RAO, 2007).

A ingestão de β -caroteno e licopeno tem mostrado relação com a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, enquanto que a ingestão de luteína e zeaxantina minimiza o risco de doenças relacionadas aos olhos (RAO, RAO, 2007).

2.2.2.1 Benefícios e riscos da ingestão de β - caroteno

O β -caroteno é o principal precursor de vitamina A e tem um papel importante em processos que envolvem a visão, diferenciação celular, síntese de glicoproteínas, secreção de

muco no tecido epitelial, reprodução, crescimento em geral e desenvolvimento de ossos (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

No final dos anos 1980 e início dos anos 90, foram apresentados numerosos estudos retrospectivos (casos-controle) e prospectivos (coorte), realizados em vários países, mostrando uma associação entre a baixa ingestão de β -caroteno, ou a sua baixa concentração plasmática, e a incidência de câncer de pulmão (ZIEGLER, 1991; VAN POPPEL, GOLDBOHM, 1995).

Contudo, alguns trabalhos começaram a apontar um efeito pró-oxidante do β -caroteno. Inicialmente foi demonstrado em ratos, os quais apresentaram aumento da atividade de enzimas da fase I no fígado, rim e intestino, assim como o aumento do estresse oxidativo. Posteriormente, estudos em humanos também demonstraram as propriedades pró-oxidantes do β -caroteno em fumantes, ex-fumantes e indivíduos expostos ao amianto (asbestos). Nesses últimos grupos, foi verificado aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer de pulmão. Essas observações sugerem uma possibilidade de resposta bifásica do β -caroteno, que é capaz de promover benefícios à saúde quando ingerido em níveis alimentares, mas pode também ter efeito adverso quando ingerido em maiores quantidades e em grupos de risco (RAO, RAO, 2007).

Diante destas constatações, Mayne (1996) desaconselhou o uso de suplementos de β -caroteno com o objetivo de prevenir as doenças cardiovasculares e o câncer pulmonar, principalmente em fumantes. Entretanto, as recomendações para aumentar o consumo de frutas e verduras ricas em carotenoides ainda deveriam ser consideradas.

Porém, foram constatadas algumas inconsistências nos achados das pesquisas. Nos estudos realizados, o β -caroteno havia sido administrado em doses mais elevadas do que os níveis normais de ingestão diária; as dietas continham outros carotenoides e constituintes alimentícios, podendo indicar a existência de sinergismo com o β -caroteno; os participantes dos estudos eram fumantes excessivos ou pessoas expostas durante longo período ao amianto, que tem efeito cancerígeno conhecido, portanto o processo de estresse oxidativo e/ou câncer poderia ter alcançado um estágio no qual o carotenoide não seria mais efetivo. Dessa forma, os carotenoides reconquistaram a sua importância na saúde, mas a ênfase foi deslocada para os carotenoides diferentes do β -caroteno. Portanto, a recomendação atual permanece sendo o aumento do consumo de uma variedade de frutas e verduras ricas em carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

2.2.3 Principais fontes de carotenoides

Dentre os alimentos brasileiros analisados quanto ao teor de β -caroteno, o buriti, que é uma fruta palmácea, apresenta a maior concentração desse carotenoide. Além disso, o buriti também contém concentrações elevadas de α -caroteno, γ -caroteno e zeaxantina. Também são fontes de β -caroteno a cenoura, a folha da cenoura, o melão de polpa amarela e acerola (PEREIRA *et al.*, 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

Algumas vezes, o α -caroteno acompanha o β -caroteno, mas geralmente em concentrações menores. Além do buriti, são fontes alimentares desses dois componentes as abóboras da espécie *Cucurbita moschata*, a cenoura e o azeite de dendê vermelho. Embora em quantidades menores do que 20 $\mu\text{g/g}$, a β -criptoxantina é o principal carotenoide de muitas frutas de polpa alaranjada, como cajá, nectarina, mamão amarelo, laranja, pêssego e tamarilho (tomate arbóreo). Já a luteína, que é um derivado di-hidroxilado do α -caroteno, é encontrada em quantidades expressivamente mais elevadas nos tecidos vegetais do que a zeaxantina, que, por sua vez, é um derivado di-hidroxilado do β -caroteno. A ocorrência limitada da zeaxantina é compreensível porque quando a mesma é formada, está sujeita à epoxidação até anteraxantina e, especialmente, violaxantina. São fontes de licopeno: o tomate, a pitanga, o mamão vermelho, a goiaba vermelha e a melancia. Já a violaxantina é o principal carotenoide de alguns alimentos, como mangas ‘Haden’ e ‘Tommy Atkins’, abricó e pimentão amarelo (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

A astaxantina é o principal carotenoide de alguns peixes, como salmão e truta, e a maioria dos crustáceos, como camarão, lagosta e caranguejo. Outro importante carotenoide encontrado nos peixes é a tunaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

2.3 Abóbora

A abóbora, com sua polpa de cor amarelo alaranjada, é uma excelente fonte de provitamina A (α e β -caroteno), podendo atender de 60 a 70% das exigências desta vitamina quando servida em duas refeições diárias. Por ser colorida e ter sabor variado, melhora as características organolépticas e sensoriais do cardápio, favorecendo a sua aceitação (ORNELLAS, 2001). As abóboras das espécies *Cucurbita moschata*, *C. maxima* e *C. pepo* são ricas em carotenoides e estão disponíveis durante todo o ano. Além disso, a alta qualidade pós-colheita permite que elas possam ser armazenadas à temperatura ambiente durante vários meses (AZEVEDO-MELEIRO, RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). Apesar disso, devido à grande dimensão dos frutos, a abóbora tem apresentado grande potencial no mercado de vegetais

minimamente processados, visto que apresentam dificuldades quanto à sua comercialização, armazenamento e manuseio (SILVA *et al*, 2009).

No Brasil, os trabalhos de melhoramento do gênero *Cucurbita* foram iniciados em 1942, pela Seção de Olericultura do Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo (RAMOS *et al.*, 1999).

2.3.1 Origem, *habitat*, distribuição e consumo

A *Cucurbita moschata* Duch, da família Cucurbitaceae, é amplamente cultivada e consumida em vários países do mundo (RODRIGUEZ-AMAYA *et al*, 2008).

De acordo com Whitaker e Bemis (1975), até aquela data, vinte e sete espécies de *Cucurbita* haviam sido descritas, das quais 5 eram cultivadas e as outras 22 permaneciam selvagens. Na figura 7, pode ser observada a provável distribuição pré-colombiana das 5 espécies cultivadas de *Cucurbita* e os centros de origem. Como pode ser notado, acreditava-se que a *C. moschata* apresentava um papel como o ancestral do grupo, que tem uma distribuição diferenciada, visto que, aparentemente, evoluiu nas Américas do Sul e Norte.

Lira e Montes (1992) reportaram que a *C. moschata* é uma espécie domesticada na América Latina. Entretanto, não se sabe, ao certo, se a domesticação se deu na América Central ou na América do Sul, sendo o centro de sua origem especificamente na Colômbia. Os resquícios arqueológicos mais antigos desta espécie foram encontrados no noroeste do México, e datam de 4900 a 3500 a.C. Também são conhecidos resquícios no norte de Belize, na Guatemala (2000 a.C. a 850 d.C.) e no Peru (3000 a.C.). A *C. moschata* é geralmente cultivada em zonas de baixa altitude e clima quente, com umidade elevada. Entretanto, já foram encontrados variantes a mais de 2200 m, em Oaxaca, México.

Segundo Camargo Filho, Mazzei e Alves (2003), as abóboras podem ser consumidas verdes ou maduras. Normalmente, as verdes são utilizadas em pratos salgados, enquanto que as maduras são utilizadas na elaboração de doces, tanto caseiros quanto industrializados e, também, em diversos pratos salgados.

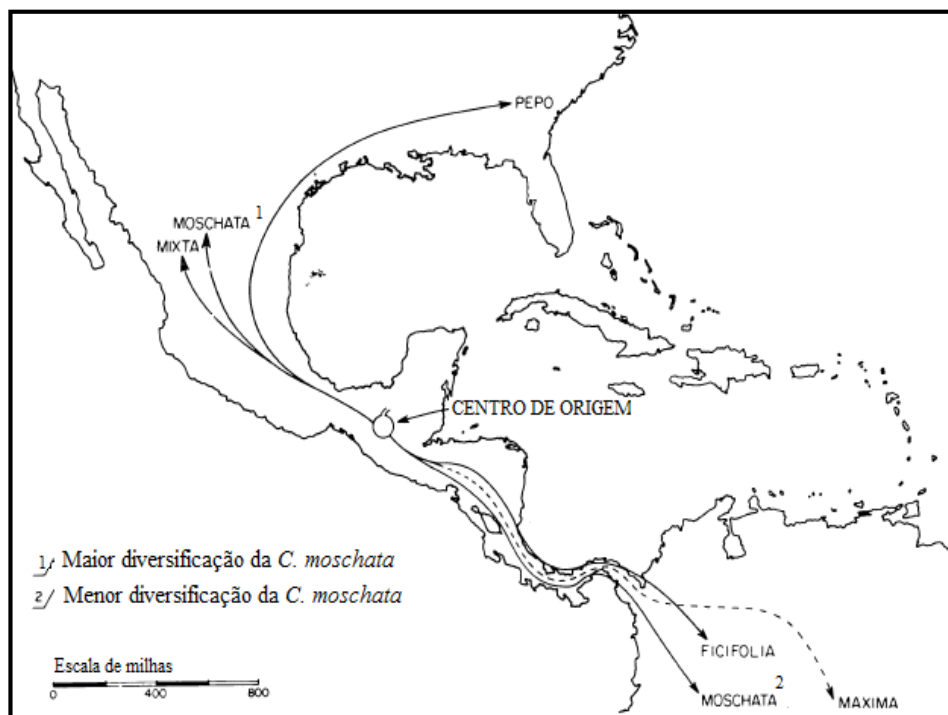


Figura 7: Provável distribuição pré-colombiana das cinco espécies cultivadas de *Cucurbita*. A linha quebrada para *C. maxima* indica que seu progenitor se modificou na América do Sul, onde as espécies evoluíram, estendendo-se pelo sul da América do Sul (Adaptado de WHITAKER, BEMIS, 1975).

2.3.2 Atividade biológica

Diferentes tipos de atividade biológica benéficos têm sido atribuídos às abóboras do gênero *Cucurbita*. A atividade antidiabética tem sido demonstrada nas espécies *Cucurbita ficifolia* e *Cucurbita pepo*, através de efeitos anti-hiperglicemiante e hipoglicemiante observados *in vitro* (KWON *et al.*, 2007), em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (XIA, WANG, 2006; XIA, WANG, 2007), em camundongos com diabetes induzida por aloxano e saudáveis (ALARCON-AGUILAR *et al.* 2002) e em pacientes com diabetes tipo 2 (ACOSTA – PATIÑO *et al.*, 2001). Além disso, a abóbora da espécie *C. moschata* tem apresentado propriedades anti-obesidade, anti-hiperlipidêmica (extrato solúvel em água PG105) e redutora dos níveis séricos de glicose (glicero-glicolipídeos QGMG-2 e QGMG-3). Por isso, seu consumo pode também ser incentivado em indivíduos obesos, portadores de dislipidemias e diabetes do tipo 2 (CHOI *et al.*, 2007; JIANG, DU, 2011).

Segundo Seo *et al.* (2005), como a abóbora da espécie *Cucurbita moschata* é rica em β -caroteno e outros carotenoides precursores de vitamina A, pode ser importante na prevenção da deficiência de vitamina A.

2.3.3 Carotenoides e composição de abóboras

Algumas variedades, como *C. moschata*, *C. maxima* e *C. pepo*, com coloração variando do amarelo intenso ao alaranjado, têm revelado teores elevados de carotenoides, principalmente α e β -carotenos, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). De acordo com Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), alterações nos teores de carotenoides do mesmo alimento são possíveis de ocorrer devido a mudanças de cultivar ocorridas no mercado brasileiro. Há diferenças dos teores de carotenoides entre as cultivares de abóbora. Em alguns casos, há predomínio de α - e β -caroteno, enquanto que, em outros, a luteína é o carotenoide principal (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, 2004). Além disso, a espécie *C. moschata*, objeto de estudo desse trabalho, possui baixo conteúdo energético, é rica em potássio, vitaminas (como B₂, C e E) e fibras (de ESCALADA PLA *et al.*, 2007; GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

De acordo com Luengo e colaboradores (2000), a abóbora (espécie não especificada) contém, em 100 g, 1,3% de fibras, 40 calorias, 280 μ g de vitamina A, 700 μ g de vitamina B₅, 100 μ g de vitamina B₂, 55 μ g de vitamina B, além de sais, potássio, sódio, ferro e enxofre.

Seo e colaboradores (2005) reportaram que o carotenoide principal encontrado na abóbora é o β -caroteno todo-*E* (>80%), seguido de luteína, licopeno, α -caroteno e *Z*- β -caroteno. Em outro estudo, teores elevados de α e β -caroteno e luteína juntamente com zeaxantina de 7,5; 6,2 e 7,5 mg/100 g, respectivamente, foram encontrados em *C. maxima*, em *C. moschata* de 5,9; 7,0 e 0,14 mg/100 g e em um cruzamento de *C. maxima* com *C. moschata* de 2,4; 3,5 e 12 mg/100 g, respectivamente, cultivadas na Áustria (MURKOVIC, MULLEDER, NEUNTEUFL, 2002).

Rodriguez-Amaya e colaboradores (2008) avaliaram os teores de α e β -caroteno em cultivares de *C. maxima* e *C. moschata*, observando que os mais elevados foram encontrados em *C. moschata* cultivar Baianinha descascada (47 μ g/g de *trans*- α -caroteno e 235 μ g/g de *trans*- β -caroteno). Já Kurz, Carle e Schieber (2008) avaliaram os teores de luteína, além de α e β -caroteno, em duas cultivares de *C. moschata*, encontrando teores de 10,60 μ g/g de α -caroteno e 8,97 μ g/g de β -caroteno e de 0,58 μ g/g de α -caroteno e 11,40 μ g/g de β -caroteno, respectivamente. Entretanto, segundo González e colaboradores (2001), os principais carotenoides isolados de *C. moschata* cultivada na Argentina foram identificados como β -caroteno, α -caroteno e luteína. Adicionalmente, identificaram, em menor quantidade, outros carotenoides, como fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno, violaxantina e neoxantina. Em algumas amostras foram encontrados ainda β -caroteno-5,6-5'6'-diepóxido e flavoxantina. A presença de isômeros *cis* do β -caroteno também foi detectada por CLAE.

A literatura apresenta vasta diferença entre teores de carotenoides em abóboras, inclusive entre cucurbitáceas de mesma variedade. Provavelmente isso ocorre devido a diferenças no tempo de maturação das abóboras. Como possuem um tempo de vida útil muito grande, as avaliações podem ter sido feitas em estádios de maturação diferentes. De fato, alguns dos níveis mais baixos de carotenoides reportados era devido à análise de abóboras imaturas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Tendo em vista a perspectiva de minimizar deficiências nutricionais, principalmente de vitamina A, em crianças e mulheres das populações carentes no Brasil, a Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, em parceria com outros centros de pesquisa da Embrapa e pesquisadores de universidades brasileiras e internacionais, iniciou, recentemente, os trabalhos de melhoramento convencional utilizando como base acessos locais e/ou selvagens de abóbora.

No Brasil, a cultivar Tieta é a mais cultivada no nordeste, porém também o sendo pelos agricultores na região sudeste. Uma alternativa para que essas populações possam ter alimentação adequada e disponível encontra-se na agricultura familiar, em que pequenos cultivos podem ser implantados em pequenas áreas e com baixo custo.

2.3.4 Morfologia das abóboras

As abóboras da espécie *C. moschata* possuem morfologia dos frutos e sementes extremamente variada. Há ampla diversidade genética nas Américas, onde essas espécies são encontradas nas mais variadas cores, texturas, formas, tamanhos e sabores (BARBOSA, 2009).

Os frutos variam muito quanto à forma e tamanho. A casca pode variar em espessura e ser lisa ou com nervuras arredondadas. Como pode ser observado na figura 8, a cultivar Cehualca se apresenta basicamente nas seguintes formas: “ovaladas”, “forma de bule”, “buchona” (formato parecido com um estômago) e “ferradura” (JACOBO-VALENZUELA *et al.*, 2011).



Figura 8: Diferentes formas assumidas pela *C. moschata* Duchense cv. Cehualca (JACOBO-VALENZUELA *et al.*, 2011).

Segundo Ku e colaboradores (2005), para algumas populações mexicanas, a forma do fruto é fundamental para determinar o tipo de aproveitamento da polpa. As formas mais achatadas são preferidas para o consumo humano, enquanto as formas de fruto piriforme e elipsoide são mais utilizadas para a alimentação animal.

Entretanto, a cultivar mais difundida e com forte aceitação no mercado regional do nordeste é conhecida popularmente como “abóbora Maranhão” ou, simplesmente, “abóbora comum”. Essas populações apresentam ampla variabilidade genética e, com isso, grande variação na coloração da casca e polpa dos frutos, tamanho, formato, espessura de polpa e diâmetro da cavidade interna dos frutos, entre outras (figura 9).



Figura 9: Variação apresentada pelos frutos de abóbora cv. Maranhão, com relação ao tamanho, formato, diâmetro da cavidade interna, espessura e coloração de polpa dos frutos avaliados (RAMOS *et al.*, 1999).

2.4 Antioxidantes em alimentos e na saúde humana

Os antioxidantes têm se apresentado como uma maneira alternativa de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e, também, minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Devido ao fato de o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos estar sendo alvo frequente de questionamentos quanto à inocuidade, havendo a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez, várias pesquisas têm sido desenvolvidas de modo a buscar compostos naturais que também possuam esta propriedade funcional (DEL RÉ, JORGE, 2012). Os antioxidantes podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os sintéticos são amplamente empregados na indústria, sendo os mais utilizados o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxiquinona terciária (TBHQ) e propil galato (PG). A sua escolha e concentração variam em função do alimento a ser empregado (HAN, RHEE, 2005; JARDINI, 2005). Entretanto, devido aos seus potenciais riscos à saúde humana, como efeitos carcinogênicos, tem aumentado o interesse pela investigação de

antioxidantes naturais (CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003) presentes em matérias-primas de origem vegetal, processadas ou não, como as frutas e hortaliças, como os tocoferóis, o ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos (JARDINI, 2005).

Os principais antioxidantes que podem ser encontrados nos vegetais são os carotenoides e vitamina E (lipossolúveis), bem como os compostos fenólicos e a vitamina C (hidrossolúveis). Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem o início da reação em cadeia ou interrompem a propagação de reações em cadeia das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007).

Normalmente, os antioxidantes naturais se dividem em duas categorias: antioxidantes de quebra de cadeia, que interferem na etapa de propagação radicalar (são exemplos os fenóis e as aminas aromáticas) e os antioxidantes preventivos, que interferem na etapa de formação dos radicais (como, por exemplo, as enzimas peroxidase e catalase) (CARDOSO, 1997).

As principais características de um bom antioxidante são a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função do seu potencial de redução; a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; a capacidade de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo e acesso ao local de ação, dependendo da sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH *et al.*, 2004).

As características químicas dos antioxidantes incluem sua solubilidade, habilidade regenerativa, relação estrutura/atividade e biodisponibilidade, que são fatores importantes quando se considera o papel destes compostos na saúde humana (KAUR, KAPOOR, 2001).

Stahl e Sies (2003) sugeriram que interações entre compostos estruturalmente diferentes e que possuem atividade antioxidante variável promovem proteção adicional contra o estresse oxidativo.

2.4.1 Substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas são uma classe extensa de antioxidantes caracterizados por apresentarem, em sua estrutura, pelo menos um anel aromático e, como substituintes, hidroxilas acopladas à estrutura do anel (SROKA, CISOWSKI, 2003). Estão presentes nos vegetais nas formas livres ou conjugadas. Mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. São produtos do metabolismo secundário² dos vegetais, e sabe-se que, além de desempenharem

² Metabólitos secundários, ou micromoléculas, geralmente são substâncias que apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. Atuam primeiramente na defesa do vegetal, agindo como dissuasórios alimentares e como toxinas (SIMÕES *et al.*, 2010).

funções de proteção, em decorrência da propriedade antioxidante, contribuem para qualidades sensoriais de vegetais como cor e adstringência (BORGUINI, 2006). O conteúdo final de compostos fenólicos presente nas frutas e hortaliças pode estar relacionado a fatores como: maturação, espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento (KIM, JEONG, LEE, 2003).

A bioatividade dos fenólicos pode ser atribuída à sua habilidade de quelar metais, inibir a peroxidação lipídica e sequestrar radicais livres (CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003). Uma substância polifenólica pode ser definida como antioxidante se preencher duas condições: quando, estando presente em baixa concentração relativa ao substrato a ser oxidado, possa retardar ou prevenir a oxidação e quando os radicais formados após a reação sejam estáveis (KAUR, KAPOOR, 2001).

Esses compostos agem como antioxidantes devido à habilidade de doar hidrogênio ou elétrons e, também, em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários componentes dos alimentos, especialmente lipídios (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSSET, 1995).

De acordo com Soares (2002), estão divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e seus derivados (figura 10) e os não-flavonoides (ácidos fenólicos ou fenóis simples).

2.4.1.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem o grupo mais distribuído de polifenóis. São constituídos de esqueletos $C_6-C_3-C_6$. As principais atividades biológicas atribuídas a estes compostos são: atividade antioxidante, efeito protetor de capilares e efeitos inibitórios de tumores em vários estágios (PODSEDEK, 2007). Estão amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, em geral podendo apresentar-se sob muitas variações, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. As principais fontes desses fenólicos são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e chá (SILVA *et al.*, 2010).

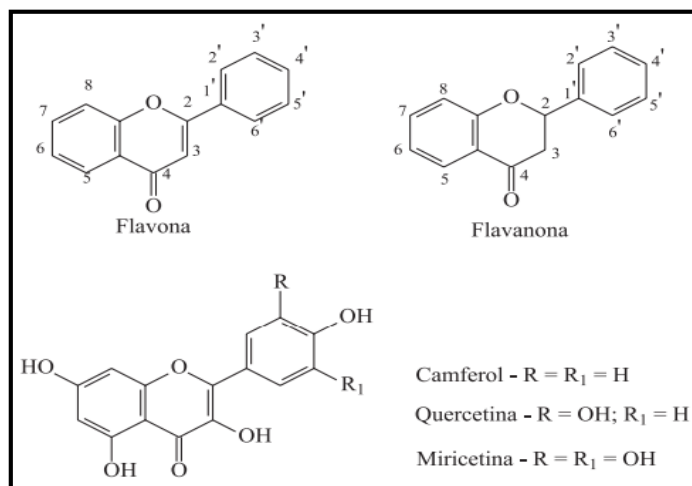


Figura 10: Representação da estrutura química de alguns flavonoides (ALVES *et al.*, 2010).

2.4.1.2 Não-flavonoides

Pertencem a esta classe os derivados dos ácidos hidroxicinâmico (figura 11) e hidroxibenzoico. Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas. Além disso, quanto maior a proximidade do grupo carboxila do grupo fenila, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta. Os ésteres dos ácidos cafeico, cumárico e ferúlico são os principais compostos fenólicos não-flavonóides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. Estão presentes em alimentos como maçã, pera, cereja e damasco. Por outro lado, os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocateico e vanílico, que são os principais derivados dos ácidos hidroxibenzoicos, podem ser encontrados em morango, uva, laranja, limão e tangerina (SILVA *et al.*, 2010).

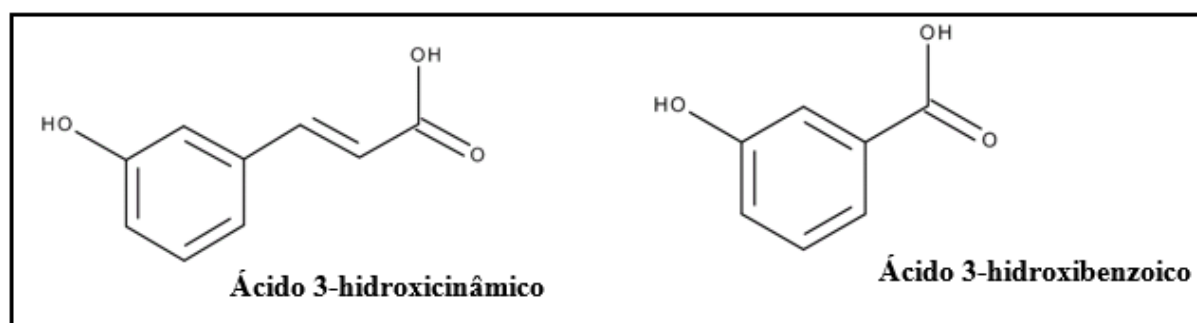


Figura 11: Representação esquemática da estrutura dos ácidos 3-hidroxicinâmico e 3-hidroxibenzoico (adaptado de Merck Chemicals, <http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/>).

2.4.1.3 Determinação de polifenóis totais

É realizada utilizando-se o reagente de *Folin Ciocalteu*, que consiste em uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). O método baseia-se no princípio de que, em meio alcalino, a mistura dos ácidos que constituem o reagente se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos túngstico (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}) de cor azul, que absorvem no comprimento de onda de 760 nm (MONTEIRO *et al.*, 2006).

2.4.2 Métodos de mensuração da atividade antioxidante *in vitro*

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de informar o seu potencial antioxidante antes de ser ingerido, é importante para avaliar sua proteção contra a oxidação e deterioração, reações estas que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional (LIMA, 2008).

Não existe um índice de avaliação da atividade antioxidante total para a rotulagem de alimentos, porque diferentemente de outros nutrientes, os antioxidantes apresentam vasta diferença em suas estruturas químicas. Como os diferentes métodos de mensuração da capacidade antioxidante dos alimentos se baseiam em mecanismos reacionais diferentes, é necessário avaliar se métodos distintos podem prover valores de atividade comparáveis para a mesma amostra. Portanto, foram descritos diferentes métodos de mensuração da capacidade/atividade antioxidante de substâncias e alimentos, como por exemplo o DPPH, o ABTS e o sistema β -caroteno/ácido linoleico, uma vez que estes se mostram necessários, devido à dificuldade de medir cada composto separadamente e as interações entre os diferentes antioxidantes no sistema (LIMA, 2008; SCHERER, GODOY, 2009).

Em um estudo comparativo, Ou e colaboradores (2002) avaliaram diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante (FRAP e ORAC) e observaram resultados discrepantes, ou seja, os valores obtidos para os dois métodos não se correlacionavam.

Para avaliar a capacidade antioxidante de um vegetal, faz-se necessário extrair o máximo possível dos compostos bioativos, os quais apresentam polaridade diferenciada. Desta forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento de extração universal (OU *et al.*, 2002).

2.4.2.1 Ensaio do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

Devido à possibilidade de deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula do radical livre (através de mecanismos de ressonância), a molécula de DPPH (figura 12) é caracterizada como um radical livre estável. Em virtude deste deslocamento, a molécula

apresenta uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004).

O método do radical DPPH consiste, portanto, na determinação da capacidade de captura do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazina pelos compostos antioxidantes. Quando adiciona-se o antioxidante, é produzida uma diminuição da absorbância proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS, CUVÉLIER, BÉRSET, 1995). Uma vantagem deste método em relação ao ABTS, por exemplo, é que o radical livre DPPH é estável e comercializado já na forma de radical, facilitando sua utilização (LIMA, 2008). Além disso, não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Tem sido muito empregado na análise de mecanismos de reação dos compostos polifenóis com radicais livres. Alguns compostos reagem rapidamente com o DPPH, reduzindo um número de moléculas igual ao número de grupos hidroxila disponíveis e formando as *orto*-quinonas correspondentes. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido, formando 1,1-difenil-2-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada por espectrofotometria (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BÉRSET, 1997; SAWAI *et al.*, 2005).

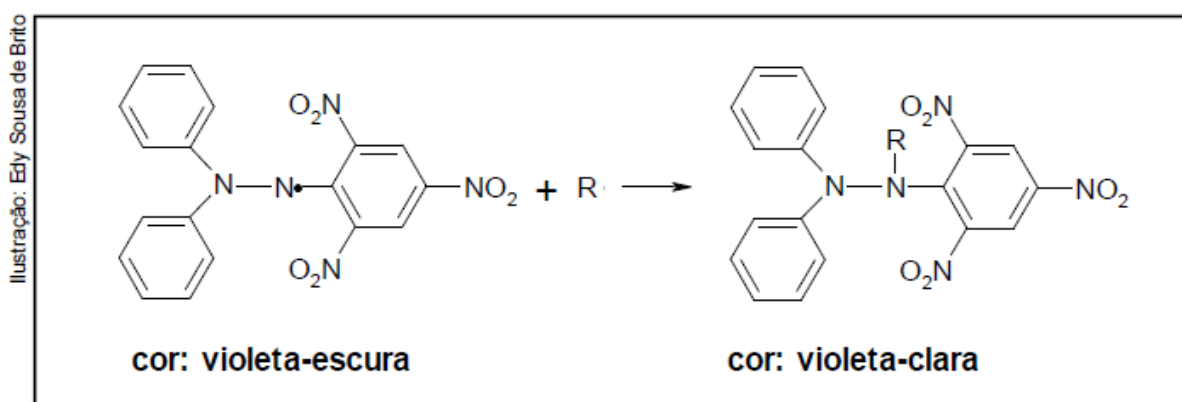


Figura 12: Representação esquemática da estrutura química do radical DPPH· e sua estabilização (RUFINO *et al.*, 2007a).

2.4.2.2 Método da captura do radical livre ABTS^{•+}

O método do radical ABTS foi desenvolvido por Cano e colaboradores (1998) e modificado e atualizado por Villano e colaboradores (2004). Consiste na produção deste radical (figura 13) a partir de seu precursor, o ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). É um composto cromóforo quimicamente estável, com alta solubilidade em água e um máximo de absorbância a 414 nm e, também, de medidas secundárias de absorbância a 645, 734 e 815 nm (MILLER *et al.*, 1993). Pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis

quanto lipossolúveis, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos. Tem sido aplicado na análise de alimentos, vinhos e cervejas, além de amostras biológicas (SCALFI *et al.*, 2000).

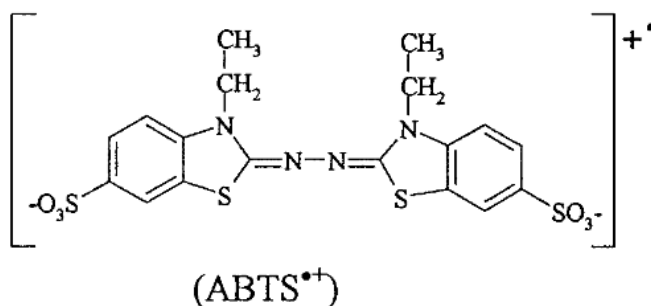


Figura 13: Representação esquemática da estrutura química do radical ABTS^{•+} (HENRIQUEZ, ALIAGA, LISSI, 2002).

A reação do ABTS com persulfato de potássio para a geração do radical livre deve ocorrer na ausência de luz de 12 a 16 h, estequiometricamente a uma relação 1 : 0,5 (ABTS : persulfato de potássio) (figura 14) (HENRIQUEZ, ALIAGA, LISSI, 2002).

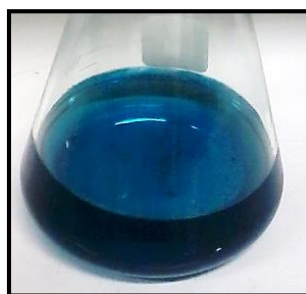


Figura 14: Imagem fotográfica da solução do radical ABTS^{•+}.

2.4.2.3 Sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

O sistema β -caroteno/ácido linoleico foi originalmente desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Utilizam-se o ácido linoleico (figura 15), o polioxietileno sorbitan monopalmitato (Tween 40) e o β -caroteno. O Tween 40 é utilizado como emulsificante, contribuindo para a dissolução completa da mistura β -caroteno e ácido linoleico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico (ALVES *et al.*, 2010).

Trata-se de um ensaio espectrofotométrico, em meio emulsionado, que avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, causado pela luz, calor e oxigênio (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Portanto, baseia-se na leitura, a 470

nm, referente à descoloração da solução preparada com β -caroteno e ácido linoleico, em meio aquoso. A descoloração é ocasionada pela oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoleico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, levando à perda de seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução) (SILVA *et al.*, 1999).

Quando antioxidantes estão presentes no sistema, protegem o ácido linoleico, postergando a formação dos radicais. A comparação dos resultados pode ser feita com padrões sintéticos, como BHA, BHT e trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina (ALVES *et al.*, 2010).

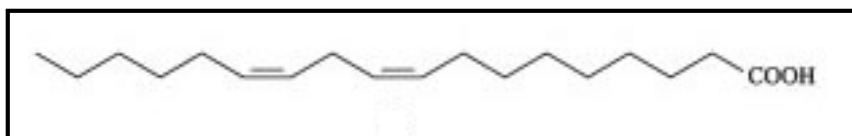


Figura 15: Representação da estrutura química do ácido linoleico (adaptado de ALVES *et al.*, 2010).

2.4.3 Consequências do processamento dos alimentos na atividade antioxidante e teor de carotenoides

No caso de comparação da ação antioxidante de hortaliças cruas e cozidas, deve-se levar em consideração que o teor de compostos bioativos em vegetais varia em função de fatores intrínsecos (cultivar, variedade e estágio de maturação) e extrínsecos (condições edafoclimáticas). Sendo assim, a retenção destes constituintes, em hortaliças cozidas, pode estar relacionada ao seu teor inicial (BRAVO, 1998).

Melo e colaboradores (2009) concluíram que hortaliças submetidas ao cozimento no vapor exibiram capacidade antioxidante diferenciada entre si, tendo o brócolis e abóbora exibido ação antioxidante superior a 70%, enquanto que a capacidade de sequestro do radical DPPH mais elevada foi verificada na couve-flor, cenoura e espinafre, não diferindo da ação do antioxidante sintético BHT. Ao comparar com estudo realizado anteriormente com hortaliças cruas, constataram que o calor aplicado não afetou de forma drástica a capacidade antioxidante das hortaliças nestes sistemas e modelos. Entretanto, os mesmos citaram que o processamento dos alimentos pode afetar o teor, a atividade e a biodisponibilidade dos componentes bioativos, uma vez que podem ser degradados ou até mesmo lixiviados para a água utilizada no cozimento.

Adicionalmente, encontram-se na literatura trabalhos científicos reportando perdas de

carotenoides quando alimentos são submetidos a diferentes métodos culinários de cozimento (GRANADO, OLMEDILLA, ROJAS-HIDALGO, 1992). Campos e colaboradores (2003), após avaliarem preparações de vegetais cozidos, concluíram que, de uma forma geral, o cozimento em água preservou bem o β -caroteno em vegetais folhosos, entretanto houve perdas próximas a 30%. Sabe-se que o tempo e a temperatura de cozimento podem causar degradação dos carotenoides com atividade provitamina A (SANT'ANA *et al.*, 1998). Entretanto, ainda há divergências sobre os efeitos do cozimento no teor de carotenoides em matérias-primas vegetais. Lucia e colaboradores (2008) ressaltam que, para muitos autores, o tratamento térmico pode aumentar a biodisponibilidade de carotenoides, devido ao fato de inativar enzimas oxidativas e desnaturar os complexos carotenoide-proteína existentes nas células vegetais.

Sultana, Anwar e Iqbal (2008) relataram que o cozimento em ebulição, fritura, e micro-ondas, salvo poucas exceções, aumentou a ação antioxidante, avaliada pelo método de determinação do poder de redução, de hortaliças quando comparada às aquelas cruas. Isso poderia ser atribuído à cisão da estrutura dos taninos ou à formação de novos compostos com ação antioxidante através da reação de Maillard. Já as diferenças nos percentuais de inibição da peroxidação lipídica encontradas nos extratos vegetais submetidos a diferentes métodos de cozimento deve ter ocorrido devido à maior facilidade de extração de compostos de tecidos lesados pelo calor e conseqüentemente maior biodisponibilidade de vários polifenóis.

Tendo em vista a necessidade de que as populações de baixa renda brasileiras tenham acesso a alimentos com elevado teor de micronutrientes, necessários a uma boa saúde, sem modificar seus hábitos alimentares, que possuam baixo custo, e que, conseqüentemente, melhorem seu *status* nutricional e, adicionalmente, possuam boa atividade antioxidante e teor de polifenóis, novos materiais (cultivares de abóbora) devem ser avaliados quanto ao seu conteúdo de α e β -caroteno e isômeros *trans* e *cis*, após o cozimento caseiro, para que possam ser introduzidos na sua dieta.

3 JUSTIFICATIVA

A abóbora da espécie *Cucurbita moschata*, como exposto anteriormente, é amplamente cultivada e consumida em várias regiões do mundo, tendo sido ainda pouco explorado e reportado na literatura científica o seu potencial antioxidante. Além disso, tratam-se de abóboras biofortificadas provenientes do projeto BioFort, coordenado pela EMBRAPA. No caso das abóboras, esse projeto visa a diminuir a desnutrição e garantir maior segurança alimentar através do aumento dos teores vitamina A na dieta da população mais carente. A biofortificação consiste em um processo de cruzamento de plantas da mesma espécie, gerando

cultivares mais nutritivas (BIOFORT, 2013). Portanto, a sua caracterização e a avaliação da sua atividade antioxidante fazem-se necessárias, bem como a investigação da presença de polifenóis envolvidos na sua composição.

Sabe-se que o consumo da abóbora cozida é prática na alimentação brasileira. Como há divergência na literatura a respeito das consequências do cozimento sobre os teores de carotenoides, polifenóis totais e, conseqüentemente, na capacidade antioxidante dos alimentos, faz-se necessária a comparação do comportamento de abóboras cruas e cozidas por diferentes métodos de cozimento usualmente empregados.

As metodologias *in vitro* aplicadas para avaliar a atividade antioxidante dos alimentos geralmente não são passíveis de correlação, visto que diversas vezes apresentam comportamentos diferentes para mesmas amostras estudadas. Portanto, como uma forma de melhor se avaliar esta propriedade, é importante utilizar mais de uma das metodologias existentes e reportadas na literatura para se obter um panorama amplo do comportamento da amostra.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Os objetivos do presente projeto são avaliar os teores de α e β -caroteno e isômeros *trans* (*E*) e *cis* (*Z*) do β -caroteno em abóboras (*C. moschata*) cruas e cozidas, a fim de determinar sua atividade antioxidante e teor de polifenóis e recomendá-las para cultivo de forma a suprir as necessidades alimentares do público alvo do projeto (populações do Norte e Nordeste brasileiro), principalmente visando a sua indicação na alimentação de crianças (escolares) e mulheres.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição centesimal das abóboras *Cucurbita moschata*;
- Determinar os teores de carotenoides totais, α e β - caroteno e isômeros *trans* e *cis* em cultivares de abóboras cruas e cozidas em água e no vapor;
- Determinar a atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico e os teores de polifenóis totais das abóboras cruas e cozidas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Abóboras

As cultivares de abóbora da espécie *Cucurbita moschata* foram cultivadas no Campo Experimental Pedro Arle, pertencente à Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no povoado Manuíno, Fazenda Queimadas, Município de Frei Paulo (SE), durante o período de julho a novembro de 2011. A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno. Dez dias após o plantio, as mudas foram transplantadas para a área definitiva, com espaçamento de 5 m entre linhas e 3 m entre plantas (RAMOS *et al*, 2010). Os frutos foram colhidos em Novembro de 2011 e foram mensuradas características agrônômicas e nutricionais.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, para os experimentos e análises. Foram recebidas oito abóboras em 22 de novembro de 2011 (figura 16). Destas, duas foram selecionadas: uma com elevados teores de carotenoides totais, α - e β -carotenos e outra com teores mais baixos desses compostos, a fim de que se pudesse comparar a atividade antioxidante em matrizes com diferentes concentrações e se influenciariam na atividade antioxidante.

As seis (6) amostras de abóbora remanescentes foram utilizadas para o desenvolvimento de outros projetos.

As duas abóboras alvo da presente dissertação foram recebidas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, com os códigos P333 F1 (elevado teor de carotenoides totais) e P261 F2 (teor menos elevado de carotenoides totais) e, para simplificar, recodificadas com os números 1 e 2, respectivamente. Como pode ser observado na figura 16, as abóboras encontravam-se íntegras no momento do recebimento, conservando-se neste estado até o momento da realização das análises.



Figura 16: Imagem fotográfica das abóboras recebidas da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, Aracajú.

5.1.2 Reagentes e produtos químicos

A acetona, o éter de petróleo, o metanol, o éter metil *terc*-butílico e o clorofórmio (grau CLAE) foram fornecidos pela Tedia. O Tween® 40 também foi fornecido pela Tedia, assim como a Celite 454. Os solventes metanol, etanol e éter etílico (grau analítico) foram obtidos da Vetec. O radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), o persulfato de potássio, o carbonato de sódio e o *Folin-ciocalteau* foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os padrões utilizados nas análises de atividade antioxidante foram ácido gálico, fornecido pela Reagen, e trolox, também obtido da Sigma-Aldrich. O ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), o β -caroteno e o ácido linoleico foram obtidos da MP. O gás nitrogênio foi fornecido pela White Martins. O BHT utilizado foi da marca Spectrum. A mistura catalítica para determinação de proteínas (*Selenium Reagent Mixture GR for the determination of nitrogen*) foi fornecido pela Merck.

5.2 Métodos

5.2.1 Medição de dimensões e pesagem das abóboras

Antes da abertura das abóboras, foram realizadas medições da altura e da largura das abóboras, bem como sua pesagem, em balança Toledo (modelo 3400/5).

5.2.2 Abertura, higienização, corte e elaboração das preparações das abóboras

No mesmo dia em que as abóboras foram abertas, todas as preparações de cozimento e a determinação da umidade foram realizadas. Além disso, as sementes das abóboras foram retiradas, lavadas e secas ao sol e reenviadas à Embrapa Tabuleiros Costeiros, para replantio. As imagens fotográficas das abóboras utilizadas encontram-se na figura 17 (A e B).

A abóbora 1 foi aberta em 10 de janeiro de 2012. A abóbora 2, por sua vez, foi aberta em 2 de abril de 2012. Como pode ser observado, ambas apresentavam características físicas visuais semelhantes e bom estado de conservação no momento da abertura.



Figura 17: Imagens fotográficas das abóboras utilizadas para realização das análises. A) Abóbora 1 (código P333 F2 da Embrapa); B) Abóbora 2 (código P261 F2 da Embrapa).

As abóboras inteiras cruas foram lavadas em água clorada para retirada de sujidades e limpeza superficial, rinsadas com água filtrada, secas com papel toalha, descascadas e abertas. Foram, então, cortadas na forma de pequenos cubos (cerca de 2 cm³). Os cubos foram pesados, aleatoriamente, formando quatro grandes grupos (1- cru; 2- cozido por imersão em água; 3- cozido no vapor e 4- preparo de doce de abóbora). O doce de abóbora foi utilizado na execução de outro projeto. Esses métodos de cozimento foram escolhidos pois tratam-se dos mais utilizados em preparações domésticas com abóboras. Os procedimentos realizados com as abóboras estão ilustrados na figura 18.



Figura 18: Imagens fotográficas de procedimentos gerais realizados com as abóboras³, como: pesagem, abertura das abóboras, corte da polpa e cozimento sob imersão em água.

5.2.3 Preparações com abóbora

a) Abóbora cozida em água: cerca de 200 g de amostra foram cozidos em panela com revestimento de teflon contendo 250 mL de água destilada. As amostras foram cozidas em água à ebulição por cerca de 5 minutos e, após o cozimento, a água foi removida e as amostras resfriadas, acondicionadas em sacos de polietileno de alta densidade e congeladas em *freezer* a -15 °C até o momento da execução das análises;

³ Essa imagem é apenas ilustrativa de alguns procedimentos realizados com as abóboras no laboratório. Foram fotografadas várias abóboras diferentes, não somente as abordadas nessa dissertação. Isso justifica a diferença na coloração da polpa no momento do corte e do cozimento.

b) Abóbora cozida no vapor: similarmente às amostras cozidas em água, utilizou-se uma panela de aço inox contendo 250 mL de água, provida de peneira para colocação das amostras que, após a ebulição, foram colocadas em contato com o vapor por cerca de 5 minutos. Após o cozimento, as amostras foram resfriadas, acondicionadas em sacos plásticos de polietileno de alta densidade e congeladas em *freezer* a -15 °C até a execução das análises.

5.2.4 Análises físicas, químicas e instrumentais

5.2.4.1 Determinação da composição centesimal

As determinações de umidade, lipídios, proteínas e cinzas foram realizadas de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) e os carboidratos determinados por diferença (NIFEXT). Os resultados foram expressos como g/100 g de amostra.

a) Umidade

O teor de umidade das diferentes preparações com as abóboras foi determinado por gravimetria, em triplicata. Foram pesados cerca de 5 g de cada amostra em cápsulas de porcelana que, depois, foram colocadas em estufa a 105 °C, onde permaneceram por cerca de 3 horas. Posteriormente, foram realizadas pesagens regulares após retirada das cápsulas da estufa, utilizando-se dessecador para o resfriamento da cápsula, à temperatura ambiente, até peso constante.

b) Lipídios ou extrato etéreo

Esta determinação também foi realizada em triplicata, pelo método de extração direta em Soxhlet. A amostra seca, obtida após determinação de umidade, foi transferida quantitativamente para um cartucho de Soxhlet, o qual foi colocado no interior de um tubo extrator. O balão de soxhlet foi previamente seco em estufa a 105 °C. Posteriormente, o sistema de soxhlet foi montado acoplando-se o balão ao extrator. Adicionou-se uma quantidade de solvente igual a 2/3 da capacidade do balão. A extração procedeu-se por aproximadamente 6 horas, com chapa aquecedora. Ao término da extração, o balão foi seco com o resíduo em estufa a 105 °C por 2 horas, aguardou-se o resfriamento do balão em dessecador e procedeu-se a pesagem.

c) Determinação de cinzas

Foram pesados cerca de 3 g de amostra em um cadinho previamente aquecido em mufla a 550 °C. Foi realizada, então, secagem da amostra em chapa elétrica, carbonização em chama

de fogão e incineração em mufla a 550 °C, até a obtenção de cinzas. Os cadinhos foram então transferidos para estufa a 105 °C, onde permaneceram por cerca de 2 horas. O resfriamento foi realizado em dessecador até a temperatura ambiente e procedeu-se a pesagem.

d) Determinação de proteínas (Nitrogênio total)

Foi pesado cerca de 1 g da amostra em papel vegetal (isento de nitrogênio), o qual foi transferido para o tubo digestor de Kjeldahl. Em seguida, acrescentou-se a mistura catalítica (*Selenium Reagent Mixture GR for the determination of nitrogen*) e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado ao tubo. Ocorreu a mineralização da amostra até que se obteve um líquido transparente. Transferiu-se quantitativamente, após resfriado, o líquido mineralizado para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. Procedeu-se, então, a destilação, utilizando uma alíquota de 10 mL do volume de 100 mL (balão volumétrico). O sal formado após o processo de destilação (borato de amônio) foi titulado com solução padrão de ácido clorídrico (HCl) 0,01N, com fator conhecido, até o ponto de viragem do indicador de Paterson.

e) Carboidratos (NIFEXT)

O teor de carboidratos totais foi obtido por diferença entre 100 e o somatório das determinações de umidade, lipídios, cinzas e proteínas.

5.2.4.2 Determinação de fibras alimentares totais

As análises de fibras alimentares totais foram realizadas na EMBRAPA Agroindústria de Alimentos de acordo com o método 985.29 da AOAC - *Association of Official Analytical Chemists* (2010).

O método baseia-se na gelatinização e hidrólise parcial do amido com uma alfa-amilase termoestável, em tampão fosfato. Em seguida, realizou-se a hidrólise da proteína com uma protease (pH 7,5; 60 °C) e a hidrólise do amido residual com uma amiloglucosidase (pH 4,5; 60 °C). Posteriormente, a porção fibra foi precipitada pela adição de etanol 95%, seguido de filtração e lavagem do resíduo com solventes. Após secagem e pesagem dos resíduos, foi feita a determinação de proteínas e cinzas no resíduo. Os valores de proteínas e cinzas devem ser descontados do valor da pesagem dos resíduos.

5.2.4.3 Valor calórico total (VCT)

Foi calculado segundo a Resolução – RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 (ANVISA, 2003).

5.2.4.4 Sólidos solúveis da polpa

Adicionou-se cerca de duas gotas de cada amostra homogeneizada em refratômetro de Abbé (marca Biobrix, modelo 2WAJ), com leitura direta a 20 °C, segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008).

5.2.5 Carotenoides totais

Para a extração dos carotenoides, foi utilizada a metodologia de Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), otimizada por Pacheco (2009), em triplicata. As amostras foram descongeladas, inicialmente, sob refrigeração (24 horas antes de iniciar a análise). Cerca de 10 minutos antes da realização das análises, os sacos de polietileno contendo as amostras foram retirados da refrigeração e colocados em armário sob a bancada, protegidos da luz por papel alumínio e em banho de água, para que atingissem a temperatura ambiente. As amostras foram pesadas em béquer em balança digital Bioprecisa (modelo FA – 2104N). O peso foi fixado em uma faixa para que a leitura em espectrofotômetro ao final da análise se situasse na faixa de linearidade (entre 0,2 e 0,8) de absorbância. Foram adicionados 3 g de celite (454) e, com o auxílio de uma espátula, a amostra foi transferida para almofariz. Os carotenoides das preparações de abóbora foram extraídos em almofariz com acetona (grau CLAE). A seguir, a pasta obtida foi filtrada em funil de placa sinterizada (n°4) acoplado a kitasato e bomba a vácuo (New Pump). Esse procedimento, desde a adição de acetona, maceração, até a filtração, foi repetido por mais 2 vezes, ou até que a amostra fosse esgotada, ou seja, apresentasse coloração branca (sem mais pigmentos alaranjados, característicos dos carotenoides).

O extrato obtido foi transferido para um funil de separação de 500 mL contendo cerca de 40 mL de éter de petróleo (grau CLAE). Foi, então, adicionada água ultrapura (Ultrapurificador de água Gehaka, modelo Master P&D) lentamente pela parede do funil para remoção da acetona. A água, juntamente com a acetona (fase inferior), foram recolhidas e devidamente descartadas. Este procedimento para remoção da acetona foi repetido quatro vezes para garantir que não mais haveria resíduo de acetona.

O extrato em éter de petróleo foi recolhido em balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de um funil contendo lã de vidro e sulfato de sódio anidro. Os carotenoides totais foram analisados em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60), na faixa do espectro visível, com leitura a 450 nm, utilizando o éter de petróleo (grau CLAE) como “branco” para zerar o aparelho.

Foi utilizada a fórmula que segue abaixo para o cálculo dos carotenoides totais presentes nas amostras:

$$\text{Conteúdo de carotenoides totais } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times \text{volume (mL)} \times 10^4}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \times \text{peso da amostra (g)}}$$

onde A= absorvância, Volume = volume total do extrato (50 mL), $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo (2592).

Após a leitura em espectrofotômetro, uma alíquota de 2 mL do extrato foi transferida para frasco âmbar de 4 mL (*vial*), devidamente identificado, com o auxílio de um pipetador automático. O éter de petróleo foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. Adicionou-se um cristal de BHT e congelou-se a -15 °C. Os *vials* foram enviados ao Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, para realização da análise cromatográfica. Foram adicionados aos *vials* 100 μ L de acetona a fim de ressuspender as amostras (extrato seco). Os extratos foram, então, colocados sob agitação em vortex Genie 2 (Scientific Industries) e transferidos para frasco âmbar de 2 mL com redutor de volume, para a realização das análises por CLAE.

5.2.6 α - e β -caroteno e isômeros *E* e *Z*

Os carotenoides α - e β -caroteno e seus isômeros *E* e *Z* foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters 2695 (modelo Alliance), com detector Waters 996, rede de Diodo UV/Vísivel de 350 nm a 600 nm, operado pelo software Empower. A coluna utilizada para as análises foi a C30 YCM Carotenoid S-3 (4,6 mm x 250 mm) de fase reversa. A fase móvel foi composta por um gradiente de metanol (grau CLAE) e éter metil *terc*-butílico (grau CLAE), segundo metodologia de Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), com adaptações de Pacheco (2009). A composição do gradiente encontra-se no quadro 1.

O padrão utilizado foi constituído por uma mistura de carotenoides extraídos de fontes naturais, de acordo com metodologia desenvolvida por Pacheco (2009).

Quadro 1: Composição do gradiente da fase móvel utilizada nas análises (adaptado de Pacheco, 2009).

Tempo (s)	% Fase A (metanol)	% Fase B (éter metil <i>terc</i>-butílico)
Inicial	80	20
30	75	25
900	15	85
903	10	90
990	10	90
993	80	20
1680	80	20

5.2.6.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas nas seguintes condições:

- Temperatura do forno da coluna cromatográfica em 33 °C;
- Fluxo da fase móvel a 0,8 mL/minuto;
- Volume de injeção de 15µL;
- Tempo de análise de 28 minutos;
- Gradiente de eluição: fases móveis: metanol (fase A) e éter metil *terc*-butílico (fase B).

5.2.6.2 Mistura padrão de carotenoides e curvas de calibração

Foi utilizado na análise cromatográfica um padrão constituído de mistura de sete carotenoides (β -caroteno, α -caroteno, luteína, violaxantina, β -criptoxantina, licopeno e zeaxantina). Foi produzido por técnica validada por Pacheco (2009), a partir de isolamento de matrizes naturais (cenoura, espinafre, pimentão amarelo, caqui rama forte e laranjinha de jardim) por Cromatografia em Coluna Aberta (CCA). O padrão possuía pureza mínima de 90% (mínimo para ser considerado satisfatório).

A partir desses padrões, foram construídas curvas de calibração para cada um dos sete carotenoides. O perfil cromatográfico da mistura multipadrão e os espectros de absorção obtidos foram salvos como Method Set do software Empower, para comparações posteriores.

5.2.6.3 Identificação e quantificação dos carotenoides nas amostras

Através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV/Vis característicos de cada carotenoide (figura 19), foi possível identificá-los.

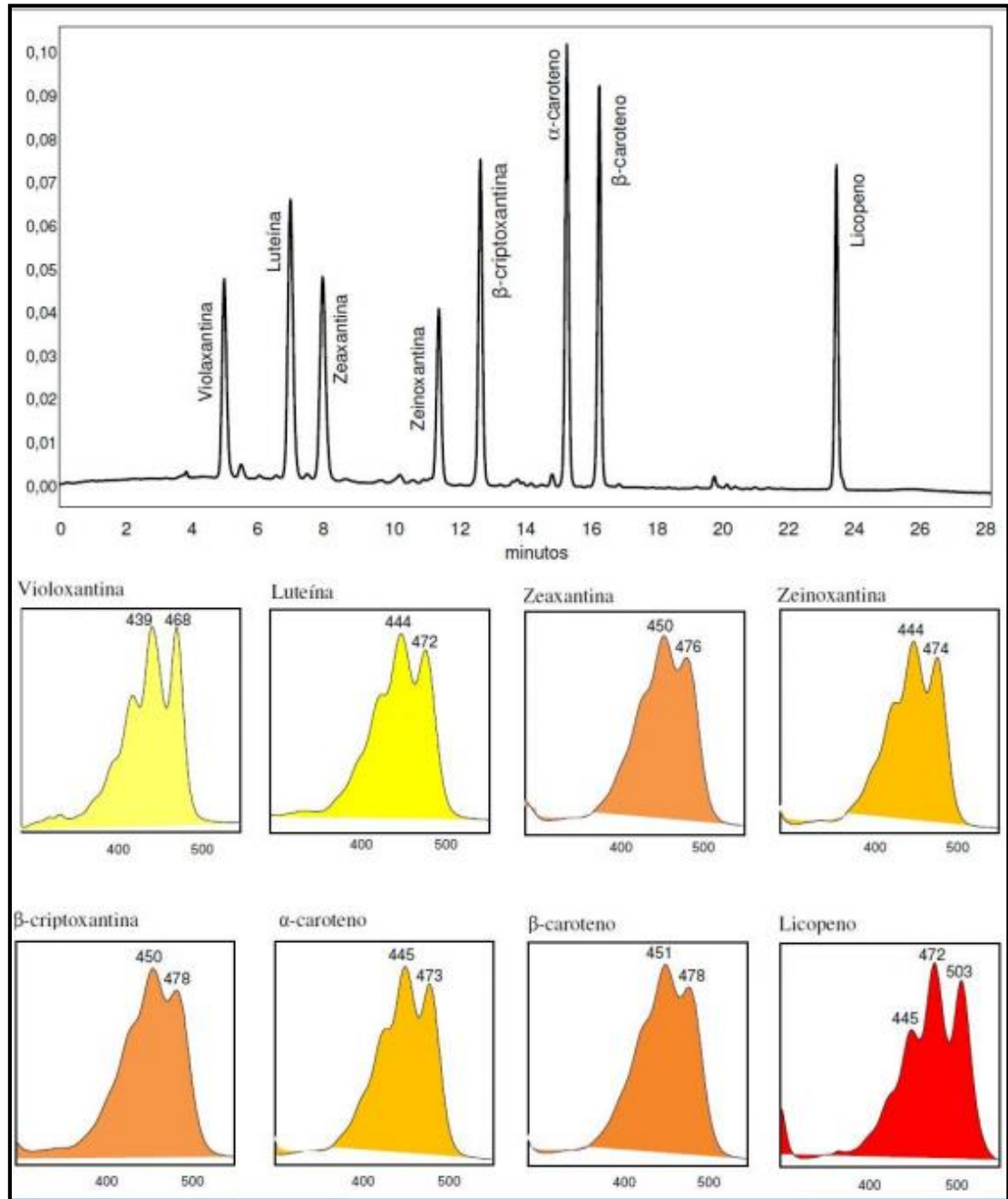


Figura 19: Perfil cromatográfico e espectros de absorção obtidos da mistura multipadrões (PACHECO, 2009).

A quantificação dos carotenoides foi realizada através da fórmula abaixo descrita.

$$\text{Teor do carotenoide} = \frac{\text{Teor de carotenoides totais} \times \% \text{ área do pico}}{100}$$

5.2.6.4 Determinação de percentual de retenção real (%RR) de carotenoides totais, α e β -caroteno

Os percentuais de retenção real (%RR) foram calculados segundo Murphy, Criner e Gray (1975), conforme a fórmula a seguir:

$$\%RR = \frac{\text{Teor de carotenoides por grama de matéria-prima cozida} \times \text{peso (g) da matéria-prima cozida} \times 100}{\text{Teor de carotenoides por grama de matéria-prima crua} \times \text{peso (g) da matéria-prima crua}}$$

5.2.7 Liofilização das amostras

Devido ao conteúdo diferenciado de água das amostras estudadas, todos os cálculos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram realizados em base seca, para possibilitar sua comparação (Turkmen, Sari, Velioglu, 2005).

As abóboras cruas e respectivas preparações, descritas anteriormente, foram submetidas ao processo de liofilização utilizando liofilizador Liotop (modelo L101). O material obtido a partir deste processo foi transferido para frascos âmbar sob atmosfera de nitrogênio, sendo armazenado em *freezer* a -15 °C até a realização das determinações descritas a seguir.

5.2.8 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

5.2.8.1 Obtenção dos extratos aquosos das amostras de abóboras liofilizadas

Foram pesados exatamente 500,0 mg das amostras liofilizadas em béquer de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura e procedeu-se a agitação em homogeneizador magnético por 1 hora. As amostras permaneceram completamente cobertas por papel alumínio e ao abrigo da luz. Os extratos obtidos foram centrifugados em centrífuga (Novatecnica, modelo NT810) a 4000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, foram filtrados a vácuo. O extrato foi recolhido em balão volumétrico de 50 mL. O procedimento foi repetido com um volume de 20 mL de água. O novo extrato também foi recolhido no mesmo balão de 50 mL e o volume completado com água.

5.2.8.2 Ensaio de quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos

Foi realizado pelo método de *Folin-Ciocalteu*, que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul, conforme descrito por Swain e Hillis (1959). O ácido gálico foi utilizado como padrão (figura 20).

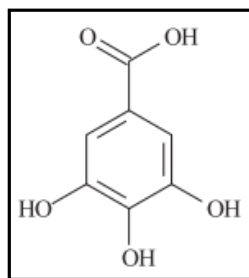


Figura 20: Representação da estrutura química do ácido gálico (adaptado de ALVES *et al.*, 2010).

Em cada tubo de ensaio foram adicionados 500 μ L de amostra (extratos das abóboras, padrão ou água), 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* (previamente diluído 1: 10 em água) e, após homogeneização em vortex e 5 minutos no escuro, 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5% (p/v). Todos os tubos foram novamente homogeneizados em vortex e abrigados em local escuro por mais 2 h. Posteriormente, foi realizada leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60) em 760 nm utilizando como branco a solução obtida através da mistura do reagente de *Folin-ciocalteu* com água e Na_2CO_3 .

Na figura 21 pode ser observada a diferença de coloração obtida para as diferentes concentrações de padrão agindo sobre o reagente *Folin Ciocalteu*.

Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg de ácido gálico/ g de sólidos totais de amostra).

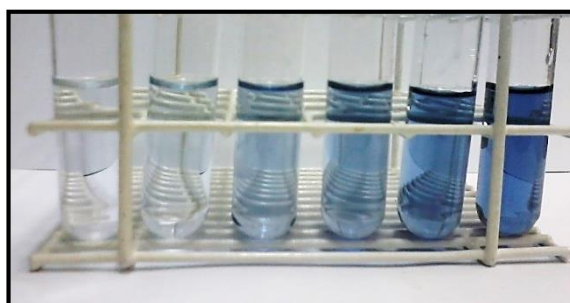


Figura 21: Imagem fotográfica ilustrativa da coloração do reagente de *Folin-Ciocalteu* frente a diferentes concentrações do padrão ácido gálico na análise de fenólicos totais.

5.2.9 Determinação da atividade antioxidante total

5.2.9.1 Obtenção dos extratos metanólicos das amostras de abóboras liofilizadas

Para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelos diferentes métodos, foram utilizados os extratos em metanol das abóboras cruas e preparações liofilizadas. Para sua obtenção, procedeu-se como na obtenção de extrato aquoso, porém, ao invés de água, utilizou-

se metanol. Os extratos foram armazenados por, no máximo, uma semana em *freezer* a -15 °C em atmosfera de nitrogênio para minimizar possíveis degradações.

5.2.9.2 Ensaios de determinação da atividade antioxidante

a) Método DPPH

A atividade antioxidante pelo método do radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com Rufino e colaboradores (2007a) e Scherer e Godoy (2009). Este método é utilizado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar radicais livres (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BERSET, 1997).

Foram utilizados 3,9 mL de solução de DPPH (0,06 mM) em metanol e 0,1 mL dos extratos metanólicos das amostras ou ácido gálico (padrão) em diferentes concentrações. Pode-se observar, na figura 22, as cubetas contendo a solução de DPPH e as diferentes concentrações do padrão. No branco, no lugar da amostra, foi adicionado 0,1 mL de metanol. Depois que a solução de DPPH já estava em contato com os extratos, os tubos foram homogeneizados em vortex (Fisatom, modelo 773) e mantidos em repouso, ao abrigo da luz, por 90 min. As soluções de DPPH e padrões foram preparadas no dia da análise.

Após esse período, a atividade antioxidante foi medida em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. O equipamento foi previamente calibrado com metanol puro.

Os resultados obtidos foram expressos como:

- Percentual de sequestro (% seq.), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ seq.} = \frac{(\text{Abs branco} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs branco}} \times 100$$

- Equivalente de Ácido Gálico (EAG), através da substituição da absorbância obtida para a amostra na equação da reta da curva padrão.

Não foi possível expressar os resultados na forma de IC₅₀ (quantidade de antioxidante requerida para obter-se 50% de inibição do radical DPPH) porque as amostras não atingiram 50% de atividade.

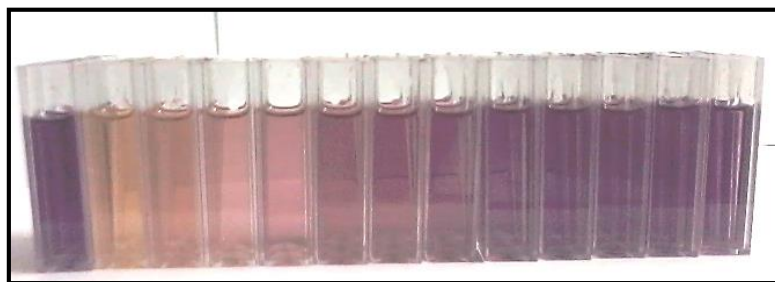


Figura 22: Imagem fotográfica da solução de DPPH com concentrações diferentes de solução de ácido gálico. Da esquerda para a direita: controle (com metanol, sem ácido gálico) e, em seguida, da maior para a menor concentração de ácido gálico.

b) Método ABTS

Consiste na produção deste radical a partir do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Foi realizado conforme descrito por Rufino e colaboradores (2007b), exceto na seção de elaboração de extrato.

O radical $ABTS^{\cdot+}$ foi gerado através da reação de 5,0 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88 μ L de solução aquosa de persulfato de potássio a 140 mM (2,45 mM de concentração final). A mistura permaneceu no escuro por 12 a 16 h e foi então diluída em etanol, a fim de que fosse obtida uma absorvância de 0,7 (\pm 0,05) a 734 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 60). O álcool etílico foi utilizado como branco, para calibrar o equipamento.

Foi preparada uma solução-mãe padrão de trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), cuja estrutura é apresentada na figura 23, na concentração de 2 mM. A partir desta, foram preparadas soluções de 100, 500, 1000 e 1500 μ M. Foram transferidas alíquotas de 30 μ L das soluções de trolox nas cinco concentrações (incluindo a solução mãe ou estoque) para tubos de ensaio. Adicionalmente, foram também transferidos a tubos de ensaio 30 μ L dos extratos metanólicos preparados a partir das amostras liofilizadas (nas concentrações de 3,33 mg/mL; 6,66 mg/mL e 10,0 mg/mL). Posteriormente, foram adicionados aos tubos 3 mL da solução resultante do radical verde-azulado $ABTS^{\cdot+}$ sem a presença de luz. As amostras contidas nos tubos foram homogeneizadas em homogeneizador vortex. A leitura em espectrofotômetro foi realizada 6 minutos após a adição do radical. Foram realizadas três análises em triplicata.

A partir da equação da reta obtida para a concentração de trolox e a respectiva absorvância, calculou-se a absorvância referente a 1000 μ M de trolox, de acordo com a equação que segue:

$$y = -ax + b$$

onde:

$x = 1000 \mu\text{M}$ de trolox

$y =$ absorvância correspondente a $1000 \mu\text{M}$ de trolox

A partir das absorvâncias obtidas das três concentrações de cada extrato, plotou-se em gráfico a concentração (mg/L) *versus* a absorvância. Determinou-se, então, a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante, substituiu-se na equação da reta a absorvância equivalente a $1000 \mu\text{M}$ do padrão trolox (obtida através do uso da equação anterior). O valor obtido para o termo x correspondente à diluição da amostra (mg/L) equivale a $1000 \mu\text{M}$ de trolox.

Os resultados foram expressos em μM trolox / g de amostra liofilizada.

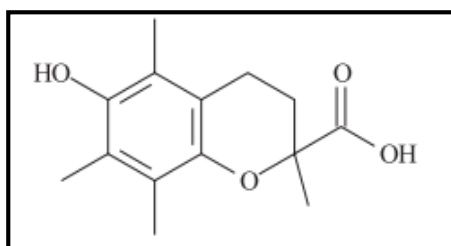


Figura 23: Representação da estrutura química do trolox (adaptado de ALVES *et al.*, 2010).

c) Sistema β -caroteno/ ácido linoléico

As análises foram realizadas de acordo com o método descrito por Marco (1968) e, posteriormente, modificado por Miller (1971), que se baseia na oxidação do β -caroteno em emulsão. A oxidação é avaliada através da observação da descoloração do sistema em espectrofotômetro.

A solução sistema β -caroteno / ácido linoleico (figura 24) foi preparada em erlenmeyer através da adição de 20 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40 e 1 mL de solução de β -caroteno em clorofórmio na concentração de 20 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada e o clorofórmio foi, então, evaporado em fluxo de nitrogênio. Adicionou-se água destilada tratada com oxigênio (com oxigenador, por no mínimo 30 min) até que fosse obtida absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm, utilizando-se água como branco. Diferentes volumes (25, 100 e 400 μL) de cada extrato foram adicionados em tubos juntamente com 5 mL da solução do sistema preparado. O conteúdo dos tubos foi transferido para cubetas, as quais foram mantidas a 50°C e leituras de absorvância em 470 nm foram realizadas em espectrofotômetro a cada 20 min,

durante 2 h. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. Foram também realizadas análises com um controle (sem antioxidante) e com os volumes de 25, 50, 200 e 400 µL de solução de Trolox a 200 mg/L, como padrão.

Os resultados foram expressos como percentuais de inibição da oxidação (% de inibição da oxidação), calculados a partir da fórmula apresentada a seguir. A redução da absorbância do sistema sem antioxidante é considerada como 100% de oxidação.

$$\% \text{ de inibição da oxidação} = \left[1 - \left(\frac{\text{abs } c_i - \text{abs } c_f}{\text{abs } am_{.i} - \text{abs } am_{.f}} \right) \right] \times 100$$

onde:

abs c_i = Absorbância inicial do controle;

abs c_f = Absorbância final do controle;

abs $am_{.i}$ = Absorbância inicial da amostra;

abs $am_{.f}$ = Absorbância final da amostra.

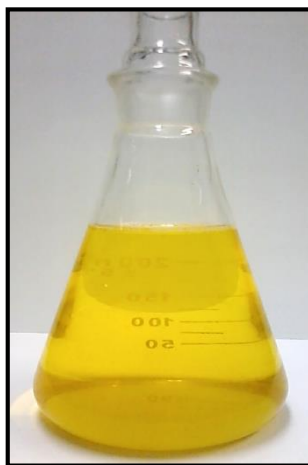


Figura 24: Imagem fotográfica da solução do sistema β -caroteno/ ácido linoleico.

5.2.10 Delineamento dos experimentos

As análises para determinação de composição centesimal, sólidos solúveis, carotenoides totais, α - e β -caroteno e isômeros 9 e 13-*cis* do β -caroteno, atividade antioxidante (todos os métodos) e polifenóis foram realizadas em triplicata.

5.2.11 Análise estatística dos resultados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® 5 para Windows. A *One-Way* Análise de Variância (ANOVA), em delineamento

inteiramente casualizado, foi realizada para avaliar a presença de efeito significativo ($p < 0,05$) e o Teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias obtidas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Medição de dimensões e pesagem das abóboras

Os valores referentes às pesagens e medidas do comprimento (altura) e largura (diâmetro) das abóboras antes da abertura encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Valores referentes à pesagem das abóboras inteiras e às medições do comprimento e da largura.

Abóbora	Massa (kg)	Comprimento (cm)	Largura (cm)
1	3,875	13,8	25,0
2	4,834	16,0	27,5

A abóbora 2 apresentou os valores de massa e volume mais elevados. Quanto ao peso do fruto, ambos os valores (3,875 kg e 4,834 kg) encontram-se de acordo com os reportados por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011), que variavam de 0,59 a 8,75 kg. Os valores também encontraram-se dentro do intervalo de variação encontrado por Ramos e colaboradores (1999), que foi de 1,879 kg a 7,189 kg, para a mesma espécie de abóbora. Porém, Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2007) encontraram variação de 1,1 a 1,3 kg, na cultivar Goianinha, e 6,6 a 10,7 kg, na Menina Brasileira. Portanto, nenhum dos dois intervalos abrange os valores encontrados nas abóboras estudadas na presente dissertação. Entretanto, segundo Ramos e colaboradores (1999), na época, a tendência comercial era para frutos de peso variando de 1,0 a 2,0 kg. Os frutos nesta faixa de peso, e até no máximo 3 kg, possibilitam maior facilidade de acondicionamento, transporte e manipulação para o processamento. Adicionalmente, cada fruto pode ser preparado em uma única refeição. Todavia, nota-se que nenhum dos frutos analisados apresentou peso dentro da faixa supracitada, sendo todos com massa mais elevada. Portanto, comercialmente, se avaliada apenas a variável massa do fruto, elas não seriam de grande valor comercial.

No que diz respeito ao comprimento dos frutos, Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) reportaram valores que variaram de 13,21 a 91,99 cm para a mesma espécie. Blank e colaboradores (2013), por sua vez, analisaram sete genótipos de abóbora *Cucurbita spp.*, tendo encontrado comprimentos que variaram de 12,60 cm, para o genótipo Samantha, a 53,37 cm, para o genótipo Menina Rajada. Barbosa (2009), avaliando seis linhagens e três cultivares de

abóbora *C. moschata* de Campos dos Goytacazes (RJ), encontrou diâmetros longitudinais de 10,12 cm, para o genótipo Jacarezinho, e de 47,54 cm, para o genótipo Menina Brasileira. Os comprimentos dos frutos (13,8 e 16,0 cm) do presente estudo também estão dentro da faixa de variação reportada em todos os estudos apresentados, sendo o valor da abóbora 1 muito próximo ao limite inferior apresentado pelos dois primeiros autores citados.

Em relação à largura, Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) reportaram valores que variaram de 11,69 a 42,97 cm, portanto, de acordo com os apresentados nesse estudo, que foram de 25,0 e 27,5 cm, para as abóboras 1 e 2, respectivamente. Já Blank e colaboradores (2013) reportaram valores que variaram de 8,96 cm, para o genótipo Mini Paulista, a 20,30 cm, para o ABO-TEST. Barbosa (2009) relatou um valor mínimo encontrado de 10,05 cm, para o genótipo Menina Brasileira, e máximo de 19,03 cm, para o genótipo L4. Portanto, as abóboras utilizadas neste estudo possuem maior diâmetro transversal do que as dos dois últimos estudos relatados, visto que possuíam 25,0 e 27,5 cm de largura.

As abóboras 1 e 2 apresentaram massas semelhantes às reportadas na literatura, mas superiores ao desejado pelo mercado. Quanto à forma, possuem características mais arredondadas, enquanto a literatura geralmente reporta a existência de abóboras *C. moschata* mais alongadas, portanto com maior altura e menor largura.

6.2 Análises físicas, químicas e instrumentais

6.2.1 Determinação da composição centesimal, fibras alimentares totais e valor calórico total (VCT)

A determinação do conteúdo de umidade das abóboras foi feita logo após sua abertura. Posteriormente, foram realizadas as análises de cinzas, proteínas, lipídios e fibra alimentar total. A partir destes resultados, foram calculados os valores referentes a carboidratos e VCT. Os resultados encontram-se na tabela 2, em g/100g de amostra.

Tabela 2: Composição centesimal (base úmida), teor de fibras alimentares totais e valor calórico total (VCT) realizadas em triplicata nos grupos de preparações das abóboras.

Abóbora	Preparação	Umidade (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lipídios (g/100 g)	Carboidratos Totais (g/100 g)	Fibra (g/100 g)	VCT* (kcal/100 g)
1	Crua	80,83 ^a ± 0,01	1,26 ^a ± 0,06	1,12 ^{ab} ± 0,04	0,8 ^a ± 0,04	15,99	Não analisado	75,64
	Cozida sob imersão	84,51 ^b ± 0,18	0,85 ^b ± 0,04	0,83 ^a ± 0,12	0,47 ^b ± 0,00	13,34	3,11	60,91
	Cozida no vapor	82,25 ^c ± 0,26	1,06 ^c ± 0,07	0,89 ^a ± 0,04	0,81 ^a ± 0,03	14,99	3,30	70,81
2	Crua	90,51 ^d ± 0,09	0,85 ^b ± 0,02	1,41 ^{bc} ± 0,04	0,27 ^c ± 0,00	6,96	Não analisado	35,91
	Cozida sob imersão	91,44 ^e ± 0,16	0,78 ^b ± 0,03	1,30 ^{bc} ± 0,12	0,73 ^a ± 0,02	5,75	2,52	34,77
	Cozida no vapor	89,94 ^d ± 0,04	0,89 ^b ± 0,02	1,47 ^c ± 0,04	0,79 ^a ± 0,06	6,91	2,25	40,63

*VCT: Valor Calórico Total

Cada valor corresponde à média ± desvio padrão, em triplicata (exceto carboidratos, fibras e VCT).

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo pós-teste Tukey.

As médias dos valores de umidade das preparações da abóbora 1 variaram de 80,83 a 84,51%, enquanto que a abóbora 2 apresentou valores mais elevados, variando de 89,94 a 91,44%. Como era esperado, as partes das abóboras submetidas ao cozimento em imersão foram as que apresentaram o maior teor de umidade. A abóbora 1 apresentou teor de umidade mais elevado para a preparação cozida no vapor do que para a crua, porém no caso da abóbora 2, não houve diferença significativa entre essas preparações.

No quadro 2 pode-se observar os valores referentes a análises de composição centesimal, fibras alimentares e VCT encontrados na literatura. Por outro lado, a tabela TACO reporta diferentes variedades da abóbora *C. moschata* (Menina Verde, Menina Brasileira e Pescoço). Não foram encontrados na literatura valores para composição centesimal, fibras e VCT de abóboras cozidas, apenas para amostras cruas.

Quadro 2: Valores de composição centesimal (g/100g), fibras alimentares totais (g/100g) e VCT encontrados na literatura para a abóbora *C. moschata* (crua).

Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios	Carboidratos Totais	Fibras	VCT* (kcal/100 g)	Fonte
86,41	-	1,0	0,1	11,69	2,0	45	USDA (2012)
79,00-93,00	0,57-0,89	0,97-1,41	0,07-0,16	1,90	0,56-1,56	-	Jacobo-Valenzuela <i>et al.</i> (2011)
88,3	0,4	1,2	0,3	9,8	0,6	40	IBGE (1999)
96; 95,7; 92,5	0,4; 0,4; 0,6	1; 0,6; 0,7	Tr.; Tr.; 0,1	3; 3,3; 6,1	1,2; 1,2; 2,3	14; 14; 24	TACO (2011)
84,84; 85,16	0,76; 0,62	1,71; 1,69	0,24; 0,25	12,43; 12,36	-	-	Neves (2011)
93,39; 95,14	0,48	1,27	0,2	4,66	1,94	15	TBCA/USP (1998)
96	-	-	-	-	1,3	40	Luengo <i>et al.</i> (2000)

Os valores de umidade em ambas as abóboras encontram-se de acordo com Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) e também Cardoso (2011), visto que, segundo o autor, a maioria das frutas e hortaliças apresentam mais de 80% de água. Os resultados encontrados corroboram. A Tabela de Composição de Alimentos do IBGE (1999), a USDA (2012) e Neves (2011) apresentaram valores intermediários entre os encontrados para as abóboras 1 e 2. Entretanto, foram relatados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) conteúdos de umidade superiores aos encontrados no presente estudo para abóboras da mesma espécie, porém em variedades diferentes (Menina Brasileira e Pescoço). Luengo e colaboradores (2000) também constataram nas abóboras avaliadas teores de umidade superiores aos encontrados, assim como os valores reportados na tabela TBCA/USP (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1998).

Segundo Pedrosa (1981), para que o fruto seja considerado de alta qualidade é necessário que ele apresente um mínimo de 17% de teor de sólidos totais ou matéria seca. Este autor propôs, então, o agrupamento de acessos de abóboras do gênero *Cucurbita* em três classes, quanto ao teor de massa seca: teor alto (mais de 15%), teor médio (10 a 15%) e teor baixo (menos de 10%). Os altos teores de matéria seca conferem ao fruto maior valor como matéria prima para a indústria (RAMOS *et al.*, 1999). Ao considerar esta classificação para as abóboras

cruas, pode-se concluir que a abóbora 1 apresenta alto teor de matéria seca (19,49%) e a abóbora 2, por sua vez, apresenta baixo teor (9,49%).

Com relação ao teor de cinzas entre as preparações, os valores foram elevados, variando entre 0,78 g/100 g e 1,26 g/100 g, sendo o maior valor obtido para a abóbora 1 crua, seguida da abóbora 1 cozida no vapor e, por último, as outras preparações da abóbora 2 e também a abóbora 1 cozida sob imersão, que não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Os valores de cinzas relatados por Neves (2011) e nas tabelas do IBGE (1999), TACO (2011) e TBCA 5.0 (USP, 1998) foram inferiores aos do presente estudo. Entretanto, valores semelhantes ao da abóbora 2 foram reportados por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011). As cinzas em alimentos são os resíduos inorgânicos remanescentes da queima da matéria orgânica, que é transformada em CO_2 , H_2O e NO_2 . Portanto, a composição das cinzas corresponde à quantidade de substâncias minerais presentes nos alimentos, devido às perdas por volatilização ou mesmo pela reação entre os componentes (CHAVES *et al.*, 2004). Desse modo, as abóboras avaliadas apresentaram conteúdo elevado de minerais quando comparadas às apresentadas na literatura. Os minerais são vitais para a saúde, visto que atuam no crescimento do corpo e seu metabolismo, nas contrações musculares e também no balanceamento da água, entre muitos outros processos (WARDLAW, INSEL, SEYLER, 1994). O cobre, por exemplo, nos organismos animais, é um microelemento essencial para diversas funções, como: mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina e componente de várias enzimas, como citocromo C-oxidase, superóxido dismutase e monoaminoxidase (FRANCO, 2001). Já a deficiência absoluta ou funcional de ferro desempenha um papel importante na gênese e na manutenção da anemia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). O cromo, por sua vez, aumenta a sensibilidade à insulina, gerando, dessa forma, aumento da captação de glicose e aminoácidos (GOMES, ROGERO, TIRAPEGUI, 2005).

Os teores de proteínas variaram de 0,83 g/100 g a 1,47 g/100 g, sendo maiores na abóbora 2. Valores próximos a estes foram relatados por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011), TACO (2011), TBCA 5.0 (USP, 1998), NutritionData.com (2011) (1%), USDA (2012) e IBGE (1999). No entanto, Neves (2011) encontrou valores superiores. Os valores encontrados para as abóboras desse estudo representam de 1,66 a 2,94% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteína, segundo a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005). Além disso, de acordo com Cardoso (2011), as proteínas contribuem com menos de 1% na composição de frutas e com 2 a 5% na composição de hortaliças, valores superiores aos encontrados para as abóboras do presente estudo. Portanto, constata-se que é um alimento com baixo teor de proteínas.

Em relação ao teor de lipídios, a maioria das frutas e hortaliças tem uma quantidade inferior a 1% (CARDOSO, 2009). As abóboras estudadas apresentaram teores muito reduzidos, assim como todas as abóboras apresentadas na literatura, podendo ser recomendadas para uma dieta na qual deseja-se baixa ingestão de calorias. Os valores, nas diferentes preparações, variaram de 0,27 g/100 g a 0,80 g/100 g. Apesar disso, os valores são superiores aos reportados por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011), USDA (2012), Neves (2011) e TACO (2011). A tabela do IBGE (1999) reporta teores bem próximos ao encontrado para a abóbora 2 crua. Como os carotenoides são pigmentos lipofílicos, é interessante que as abóboras apresentem teores de lipídios superiores aos reportados na literatura, visto que podem apresentar maiores teores desses compostos e também facilitar sua absorção.

Os valores de carboidratos totais foram bem superiores na abóbora 1, variando de 13,34 g/100 g a 15,99 g/100 g, em relação à abóbora 2, que variaram de 5,75 g/100 g a 6,96 g/100 g. Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) e a tabela TBCA 5.0 (USP, 1998) apresentaram valores inferiores. Os valores da abóbora 2 são semelhantes ao reportado na tabela TACO (2011) para a variedade Pescoço (6,1%). As outras variedades apresentaram valores bem inferiores. Entretanto, Neves (2011) e as tabelas do IBGE (1999) e USDA (2012) reportam valores intermediários entre as abóboras 1 e 2. Segundo Cardoso (2009), de uma maneira geral, os carboidratos são os componentes mais abundantes nos vegetais depois da água. Esse padrão pode ser observado nas amostras estudadas. Entretanto, ainda segundo o mesmo autor, uma porção significativa dos carboidratos encontrados está na forma de fibras dietéticas, como será discutido a seguir.

Como a abóbora não é consumida crua, optou-se pela realização da análise de fibras alimentares apenas nas preparações cozidas. Os resultados obtidos quanto ao teor de fibras (2,25 a 3,30%) foram bem mais elevados que os reportados na tabela do IBGE (1999) e por Jacobo-Valenzuela (2011), embora todas as tabelas utilizadas na discussão apresentem valores apenas para abóboras cruas. Entretanto, os valores da abóbora 2 foram próximos aos relatados na tabela TACO (2011) para a variedade Pescoço (2,3%), na USDA (2012) e também na tabela TBCA/USP 5.0 (1998). As variedades Menina Brasileira e Menina Verde, na tabela TACO, apresentaram valores inferiores. A abóbora 1 apresentou valores superiores a todos os reportados na literatura.

As fibras possuem propriedades benéficas à saúde. Atuam reduzindo a absorção de ácidos biliares; têm atividades hipocolesterolêmicas; parecem reduzir os níveis de triglicerídeos e colesterol; estimulam a motilidade intestinal, aumentam a excreção de ácidos biliares, têm propriedades antioxidantes e diminuem os riscos de desenvolvimento de câncer (MORAES,

COLLA, 2006). Portanto, trata-se de uma vantagem o fato de as abóboras utilizadas no presente trabalho possuírem valores elevados dessa classe de substâncias em relação à literatura.

O VCT variou de 60,91 a 75,64 kcal, nas diferentes preparações da abóbora 1, e 34,77 a 40,63 kcal, na abóbora 2. Como os teores de lipídios e carboidratos da abóbora 1 foram elevados em relação aos reportados na literatura, de uma forma geral, era esperado que os valores de VCT também o fossem. As tabelas TACO (2011) (para diferentes variedades de *C. moschata*), USDA (2012) e TBCA/USP 5.0 (1998) reportam valores inferiores aos das duas abóboras. Entretanto, Luengo e colaboradores (2000) e a tabela do IBGE (1999) apresentam valores semelhantes ao da abóbora 2.

De acordo com os resultados obtidos na determinação da composição centesimal, pode-se verificar que não se trata de um fruto calórico, entretanto, de uma forma geral, em relação aos dados reportados pela literatura, a abóbora 1 apresentou maiores teores de fibras, cinzas e carboidratos, enquanto que a abóbora 2 apresentou maiores teores de proteínas. Os valores de lipídios de ambas as abóboras foram superiores aos da literatura.

6.2.2 Sólidos solúveis da polpa

Os resultados encontrados para a determinação de sólidos solúveis (expressos em °Brix) podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Sólidos solúveis, expressos em °Brix, das preparações das abóboras 1 e 2.

Abóbora	Preparação	Sólidos Solúveis (°Brix)
1	Crua	13,17 ± 0,06 ^a
	Imersão	9,80 ± 0,10 ^b
	Vapor	12,13 ± 0,12 ^c
2	Crua	8,10 ± 0,10 ^d
	Imersão	6,20 ± 0,00 ^e
	Vapor	7,73 ± 0,06 ^f

Cada valor corresponde à média ± desvio padrão, em triplicata.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo pós-teste Tukey.

Todos os valores de sólidos solúveis apresentaram diferença estatística, ao nível de 5% de significância, sendo que a abóbora 1 obteve maiores valores em todas as preparações. Em ambas as abóboras, o teor de sólidos solúveis foi mais elevado nas amostras cruas (13,17 e 8,10

°Brix, abóbora 1 e 2, respectivamente), seguidas pelas amostras cozidas no vapor (12,13 e 7,73 °Brix) e, por último, as cozidas sob imersão em água (9,80 e 6,20 °Brix). Como as amostras cozidas permaneceram em contato com a água, ou o vapor de água, era esperado que o teor de sólidos solúveis fosse menor devido às perdas por dissolução.

Na literatura, foram encontrados apenas dados para abóbora crua. Os valores encontrados para a abóbora 1 foram consideravelmente elevados em relação à variação reportada por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) (5,40 a 11,0 °Brix) e Santos e colaboradores (2011) (5 a 10 °Brix) para abóboras comerciais. Estes valores, por sua vez, englobam o avaliado na abóbora 2. Por outro lado, frutos procedentes do programa de melhoramento Biofortificação apresentaram teores de sólidos solúveis entre 10 e 20 °Brix no estudo realizado por Santos e colaboradores (2011). O teor de sólidos solúveis apresentado pela abóbora 1 encontra-se de acordo com esse intervalo. De acordo com Ramos e colaboradores (1999), após a colheita, durante o processo de amadurecimento, o amido é convertido em açúcares, ocorrendo aumento nos sólidos solúveis totais. Essas medidas são, portanto, indicativas do grau de maturação dos frutos, mas há variação dependendo do ambiente onde foi conduzido o experimento e o manejo da cultura, bem como, do controle efetuado na época da colheita. O ponto máximo do teor de sólidos solúveis é alcançado em períodos mais avançados de maturação. Segundo Roura e colaboradores (2007), amostras de abóbora com sólidos solúveis na faixa entre 4-8 °Brix são consideradas imaturas; entre 8-11 °Brix, maduras e com conteúdo acima de 11 °Brix, muito maduras porém consumíveis. Portanto, de acordo com essa classificação, a abóbora 1 é considerada muito madura, porém ainda própria para o consumo, enquanto a 2 é classificada como madura.

6.2.3 Carotenoides totais, α -caroteno e isômeros *trans* (E) e *cis* (Z) do β -caroteno

Os cromatogramas referentes aos carotenoides e isômeros *cis* do β -caroteno das abóboras *Cucurbita moschata* 1 e 2 podem ser visualizados nas figuras 25 e 26.

Como pode ser observado, o β -caroteno (isômero todo-*E*) é o carotenoide mais abundante, apresentando o maior pico, e o α -caroteno é o segundo maior pico, seguido do 13-Z- β -caroteno e 9-Z- β -caroteno. Adicionalmente, na abóbora 2 foram identificadas a luteína e a β -criptoxantina, entretanto, não foram quantificadas, visto que o objetivo do estudo foi avaliar os α - e β -carotenos.

A β -criptoxantina possui atividade provitamina A (50% da atividade do β -caroteno), porém a luteína não a possui, embora ambas apresentem atividade antioxidante. A β -criptoxantina foi mais efetiva como antioxidante contra o radical alquilperoxila (ROO•) em

membranas lipossomais que o β -caroteno e o licopeno em estudo realizado por Woodall, Britton e Jackson (1997). Adicionalmente, o consumo de β -criptoxantina e luteína é associado a uma redução do risco de doença arterial coronariana em mulheres. A luteína, juntamente com a zeaxantina, constituem o pigmento de cor amarela da mácula da retina humana, sendo responsáveis pelo efeito protetor oftalmológico dos carotenoides, atuando tanto como antioxidantes quanto como filtros da luz azul de alta energia (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

Na tabela 4 encontram-se os teores médios ($\mu\text{g/g}$) e respectivos desvios-padrão (DP) dos carotenoides totais, α -caroteno, todo-*E*-, 13-*Z*- e 9-*Z*- β -caroteno encontrados nas amostras de abóbora (*C. moschata*) 1 e 2 cruas, cozidas por imersão em água e no vapor.

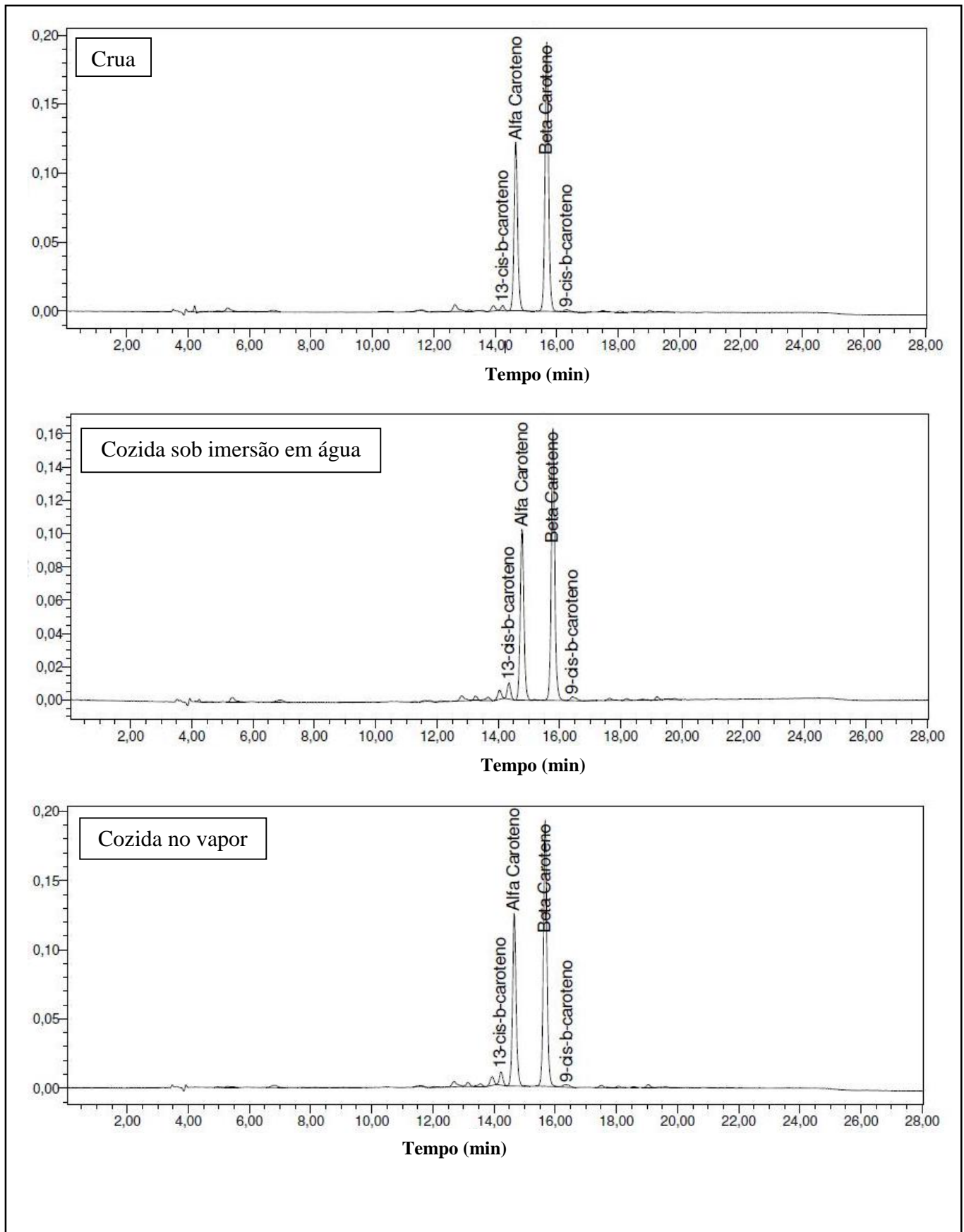


Figura 25: Cromatogramas das preparações da polpa da abóbora *C. moschata* 1.

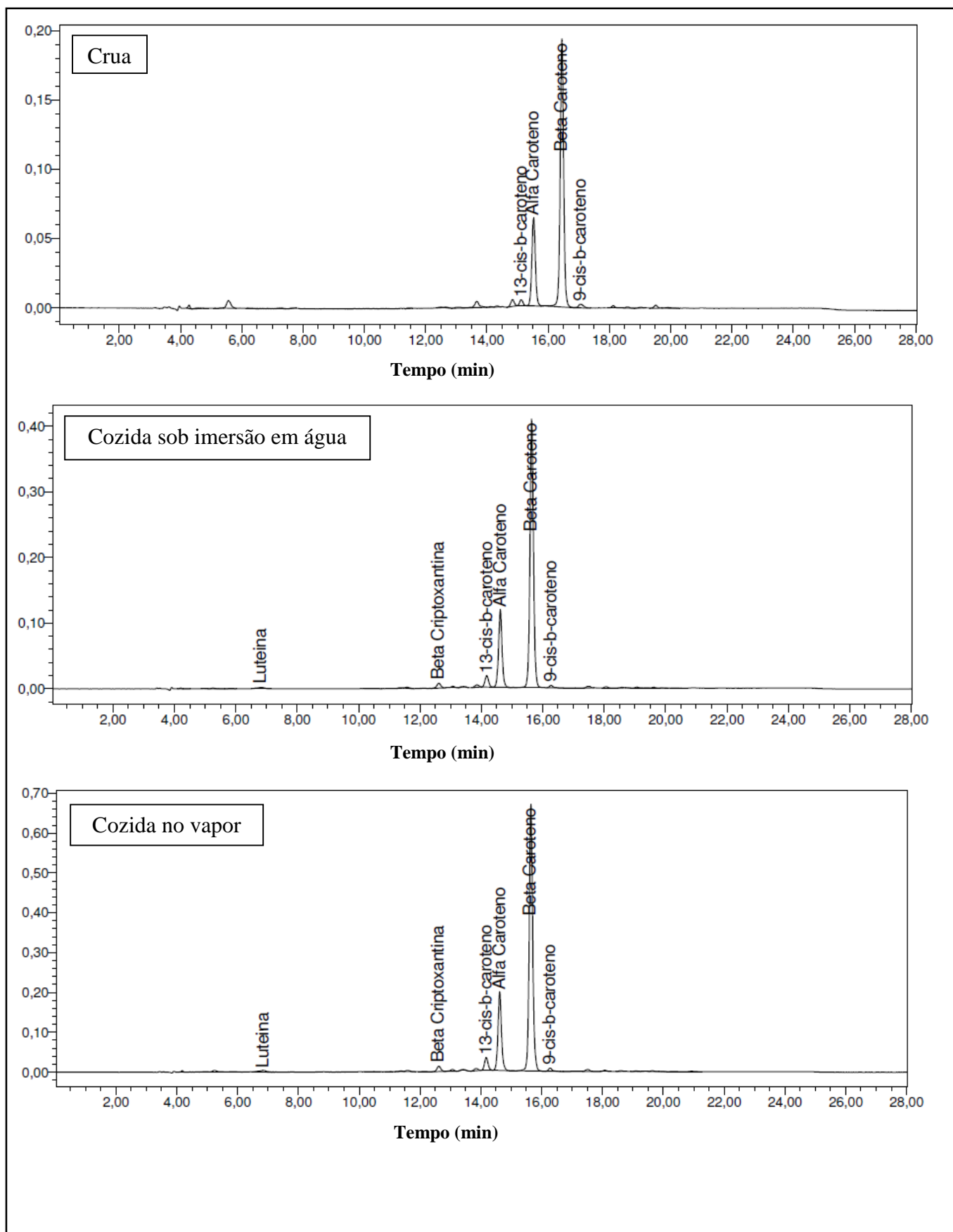


Figura 26: Cromatogramas das preparações da polpa da abóbora *C. moschata* 2.

Tabela 4: Carotenoides totais, α -caroteno e isômeros do β -caroteno (todo-*E*, 13-*Z* e 9-*Z*) em $\mu\text{g/g}$ das abóboras 1 e 2.

Abóbora	Preparação	Carotenoides Totais	α -caroteno	Todo- <i>E</i> - β -caroteno	13- <i>Z</i> - β -caroteno	9- <i>Z</i> - β -caroteno
1	Crua	589,12 ^a ± 6,74	207,09 ^a ± 6,99	317,12 ^a ± 5,46	7,77 ^{ad} ± 0,11	6,54 ^a ± 0,31
	Imersão	638,74 ^b ± 1,81	214,55 ^a ± 3,80	330,57 ^{ab} ± 4,03	17,61 ^b ± 1,22	7,12 ^b ± 0,12
	Vapor	655,30 ^b ± 10,73	229,97 ^b ± 2,41	339,61 ^b ± 8,06	16,31 ^b ± 0,31	5,17 ^c ± 0,20
2	Crua	234,41 ^c ± 1,26	49,63 ^c ± 1,21	161,19 ^c ± 4,48	3,21 ^c ± 0,25	2,89 ^d ± 0,25
	Imersão	242,49 ^c ± 8,53	48,20 ^c ± 1,52	164,72 ^c ± 4,19	7,32 ^d ± 0,19	2,21 ^d ± 0,15
	Vapor	274,87 ^d ± 10,12	55,64 ^c 1,91	191,59 ^d ± 7,88	7,04 ^d ± 0,24	2,29 ^e ± 0,07

Cada valor corresponde à média ± desvio padrão, em triplicata.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo pós-teste Tukey.

De modo a facilitar a discussão dos resultados, os valores de carotenoides totais, α -caroteno, β -caroteno e isômeros 13-*cis* e 9-*cis* encontrados na literatura para a abóbora *C. moschata*, em diferentes preparações e variedades, encontram-se no quadro 3, observando-se que os valores reportados apresentaram grande variação.

Quadro 3: Carotenoides totais, α -caroteno, β -caroteno e isômeros 13-Z e 9-Z ($\mu\text{g/g}$), segundo a literatura, em abóboras *C. moschata* em diferentes preparações e variedades.

Preparação	Totais	α -caroteno	β -caroteno	13-Z- β - caroteno	9-Z- β - caroteno	Referências
Crua	344,70; 234,21	66,23; 71,24	244,22; 141,25	3,05; 1,49	1,62; 0,61	Neves (2011)
Imersão	358,47; 205,73	54,44; 57,64	274,79; 117,35	16,38; 9,08	8,55; 1,42	Neves (2011)
Vapor	401,68; 227,07	64,88; 68,98	304,88; 126,89	9,13; 7,49	1,85; 1,68	Neves (2011)
Crua	160-1399,4	6-47	0,006- 2340,0	-	-	Jacobo- Valenzuela <i>et al.</i> (2011)
Crua	-	-	aprox. 18,0	-	-	Azizah <i>et al.</i> (2009)
Imersão (2, 4 e 6 min)	-	-	aprox. 40; 80 e 70	-	-	Azizah <i>et al.</i> , (2009)
Imersão	-	5,92	24,09	-	-	Higdon (2005)
Crua *(Menina Brasileira; Goianinha)	-	26,8; 23,8	66,7; 56,7	-	-	Azevedo- Meleiro, Rodriguez- Amaya (2007)
Crua	-	-	10,6	-	-	Kalluf (2006)
Crua	-	9,8-59	31-70	-	-	Murkovic, Mülleder, Neunteufl (2002)
Crua	404,98; 234,21	67,06; 72,99	244,22; 141,95	3,67; 1,84	2,34; 0,97	de Carvalho <i>et al.</i> (2012)
Crua *(Baianinha, Goianinha, Menina)	-	47; 24; 0,1	235; 57; 1,5	-	-	Rodriguez- Amaya, Kimura, Amaya-Farfan (2008)
Crua	13,78- 974,27	2,88 – 92,21	7,12– 307,70	-	-	Carvalho, Peixoto e Ferreira (2011)

*Variedades de abóbora *C. moschata*.

Os teores de carotenoides totais, entre as preparações, variaram de 589,12 a 655,30 $\mu\text{g/g}$ na abóbora 1 e de 234,41 a 274,87 $\mu\text{g/g}$ na abóbora 2. Portanto, a abóbora 1 apresentou teores mais elevados de carotenoides totais do que a abóbora 2. Estes teores encontram-se dentro do intervalo reportado por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011). Todos os outros valores

reportados são inferiores aos da abóbora 1. Pode-se, então, concluir que a abóbora 1 apresenta teores elevados de carotenoides totais.

Costuma-se observar aumentos nos teores de carotenoides totais em função do amadurecimento, ou seja, frutas apresentam maiores teores de carotenoides quando colhidas maduras (MERCADANTE, RODRIGUEZ-AMAYA, 1998). Considerando-se que as abóboras analisadas são de mesma procedência e foram cultivadas nas mesmas condições, as diferenças tão exacerbadas nos teores de carotenoides apresentadas entre as abóboras pode ser atribuída a diferenças no estágio de maturação, visto que a abóbora 1, classificada como mais madura, devido ao maior teor de sólidos solúveis, foi a que apresentou maior teor de carotenoides.

Durante o processo de amadurecimento, há degradação das clorofilas a e b e de pigmentos subjacentes, bem como síntese de novos pigmentos, como os carotenoides. Além disso, também estão envolvidos nesse processo alterações de sabor, diminuição de acidez e adstringência, com elevação no teor de sólidos solúveis e mudanças na textura (DOMINGUES, ONO, RODRIGUES, 2001).

Por outro lado, o teor de carotenoides totais da abóbora 2 crua é semelhante a um dos valores reportado por Neves (2011) e por de Carvalho e colaboradores (2012).

Em ambas as abóboras, o menor valor foi encontrado na amostra crua e o maior na abóbora cozida no vapor, sendo que os cozimentos em imersão e no vapor na abóbora 1 não apresentaram diferença significativa, enquanto que na abóbora 2 crua e a cozida em imersão também não houve diferença ($p < 0,05$). Pode-se, portanto, concluir que os carotenoides aumentaram com o cozimento e cogita-se que houve liberação dos carotenoides após o cozimento, fenômeno este já amplamente reportado na literatura (LESSIN, CATIGANI, SCHWARTZ, 1997) e discutido na seção 2.4.3 da presente dissertação. Neves (2011) reportou comportamento semelhante em uma das abóboras (houve aumento do teor de carotenoides após o cozimento). Entretanto, o mesmo não ocorreu com a outra amostra avaliada.

Os teores de α - e β -caroteno das amostras cozidas no vapor foram os mais elevados. Adicionalmente, a abóbora 1 apresentou valores mais elevados do que a abóbora 2.

Os valores do α -caroteno variaram de 207,09 $\mu\text{g/g}$ de amostra (abóbora crua) a 229,97 $\mu\text{g/g}$ (cozida no vapor), na abóbora 1, e de 48,20 $\mu\text{g/g}$ (imersão) a 55,64 $\mu\text{g/g}$ (vapor), na abóbora 2.

Os teores do todo- E - β -caroteno, por sua vez, variaram de 317,12 $\mu\text{g/g}$ (crua) a 339,61 (vapor), na abóbora 1, e de 161,19 $\mu\text{g/g}$ (crua) a 191,59 $\mu\text{g/g}$ (vapor), na abóbora 2. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras cruas e cozidas em imersão tanto para o α -caroteno quanto para o todo- E - β -caroteno, em ambas as abóboras. Entretanto, vale salientar

que, na abóbora 1, os teores de todo-*E*- β -caroteno das amostras cozidas em imersão e no vapor também não apresentaram diferença significativa.

Os teores de α -caroteno na abóbora 1 foram extremamente superiores aos reportados na literatura. Entretanto, os da abóbora 2 foram, de uma forma geral, semelhantes aos relatados. Os valores encontrados para a abóbora 2 cozida em imersão foram semelhantes aos reportados por Neves (2011), enquanto que os valores para a amostra crua encontram-se dentro dos intervalos reportados por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011) e Carvalho, Peixoto e Ferreira (2011) sendo também semelhantes aos de Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008).

Em relação aos teores de β -caroteno, os resultados das abóboras 1 e 2 encontram-se dentro do intervalo reportado por Jacobo-Valenzuela e colaboradores (2011). Adicionalmente, os valores encontrados na abóbora 2 encontram-se entre os relatados para as duas abóboras avaliadas por Neves (2011) e de Carvalho e colaboradores (2012).

Os isômeros 13- e 9-*Z*- β -caroteno, como esperado, foram bem menos elevados do que os carotenoides majoritários, sendo que a abóbora 1 apresentou valores superiores aos da abóbora 2.

De uma forma geral, os teores de 13-*Z*- β -caroteno foram mais elevados nas amostras cozidas do que nas cruas, variando de 7,77 a 17,61 $\mu\text{g/g}$ (abóbora 1), e de 3,21 a 7,32 $\mu\text{g/g}$ (abóbora 2), o que é esperado, devido à isomerização *trans-cis* promovida pelo aquecimento.

O conteúdo do isômero 9-*Z*- β -caroteno nas amostras cozidas no vapor foi inferior, variando de 5,17 a 7,12 $\mu\text{g/g}$ (abóbora 1) e de 2,21 a 2,89 $\mu\text{g/g}$ (abóbora 2). Os teores de isômeros *cis* do β -caroteno encontrados no presente estudo são semelhantes a alguns reportados por Neves (2011). Normalmente seu conteúdo é reduzido em relação ao isômero 13-*Z*- β -caroteno. Costa, Ortega-Flores e Penteadó (2001) concluíram que a mistura do isômeros 13-*Z* e todo-*E* do β -caroteno resultou em melhor conversão a retinol que a mistura de todo-*E* com o 9-*Z*. Portanto, trata-se de uma vantagem o isômero 13-*Z* apresentar-se em maior quantidade.

A presença de maiores teores de isômeros *cis* do β -caroteno, principalmente do 13-*E* nas abóboras cozidas, deve-se aos processos de cozimento e também de trituração da amostra. A trituração também pode justificar a presença desses isômeros nas amostras cruas, devido à exposição ao oxigênio, porém em menor quantidade (RODRIGUEZ-AMAYA, AMAYA-FARFAN, 1992).

Há divergência na literatura quanto aos efeitos do cozimento sobre o teor de carotenoides em vegetais. Alguns autores reportam que o cozimento pode causar perdas (GODOY, RODRIGUEZ-AMAYA, 1998; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-

FARFAN, 2008), enquanto que outros reportam seu aumento, atribuindo-os ao cozimento ou ao processamento térmico, que abrandaria as estruturas vegetais. Os aumentos são ainda atribuídos a erros analíticos ou forma de cálculo.

Relatos de aumento nos teores de carotenoides atribuídos ao cozimento ou ao processamento térmico são mais provavelmente devidos à análise ou forma de cálculo do que a aumentos reais. A perda de carotenoides na amostra fresca catalizada [sic] por enzimas liberadas durante o preparo para análise, a maior extratabilidade [sic] do analito na amostra processada, as perdas de água não contabilizadas e a lixiviação de sólidos da matriz para a água de cocção são fatores que podem levar aos supostos aumentos. Em preparações domésticas, as perdas de carotenoides aumentam geralmente na seguinte ordem, segundo o tipo de cocção: micro-ondas < ao vapor < fervura < refogado. Fritura por imersão, fervura prolongada, combinação de vários tipos de cocção, assamento [sic] e marinados, todos provocam perdas consideráveis de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

No entanto, outros estudos reportam que as perdas foram inexistentes ou houve ainda aumento dos teores (GRANADO, OLMEDILLA, ROJAS-HIDALGO, 1992; HART, SCOTT, 1995; LESSIN, CATIGANI, SCHWARTZ, 1997). Este aumento tem sido atribuído a uma maior eficiência na extração devido ao fato de o tratamento térmico inativar enzimas oxidativas e desnaturar o complexo carotenoide-proteína existente nas células vegetais. Adicionalmente, alguns estudos têm mostrado que a biodisponibilidade de carotenoides em vegetais pode aumentar com o processamento e o tempo aplicados. Portanto, é possível que, mesmo havendo perdas significativas após o processamento, os carotenoides que se mantêm sejam melhor absorvidos (ROCK, 1997; LUCIA *et al.*, 2008). Por outro lado, embora não tenha sido reportado pela literatura, a bioacessibilidade, principalmente do β -caroteno, pode ser comprometida de acordo com o tempo de cozimento insuficiente (reportado acima). Estudos realizados em parceria da Faculdade de Farmácia/ Laboratório de Tecnologia e Análise Instrumental de Alimentos com a Universidade Estadual de Ohio, Estados Unidos, estão sendo conduzidos a fim de que se determine o quanto a bioacessibilidade do β -caroteno em abóboras pode ser afetada de acordo com o tempo de cozimento.

Por outro lado, segundo estudo realizado por Abreu e Barcelos (2012), o processamento térmico, em condições domésticas, aumentou a atividade antioxidante total da polpa de tomate, os teores de carotenoides (principalmente o licopeno) e compostos fenólicos. Adicionalmente, segundo relatos de Ruel (2001), o processamento doméstico dos alimentos, seja através do cozimento ou da fritura, pode aumentar a bioacessibilidade de carotenoides com atividade provitamina A. No entanto, pode promover simultaneamente perdas de carotenoides, tanto por oxidação quanto por isomerização.

Visando a uma possível melhoria no processo de extração de carotenoides das amostras cruas, foi testada a saponificação das amostras. Na saponificação, o extrato obtido na etapa de extração é exposto a uma determinada concentração de hidróxido de potássio, por um período de tempo, seguida de sucessivas lavagens com água, para retirada do álcali. Esse processo promove a hidrólise dos ésteres de carotenoides e remove lipídios e clorofilas que, eventualmente, podem interferir na análise, normalmente facilitando a identificação, separação e quantificação de carotenoides. Entretanto, houve redução do conteúdo de carotenoides encontrados. Diante destes resultados, a saponificação foi descartada como uma etapa viável na extração dos carotenoides do presente estudo, tendo em vista que o tempo de exposição ao álcali pode ser considerado como responsável pela diminuição dos teores de carotenoides totais (MERCADANTE, 1999; PENTEADO, 2003).

Como a abóbora 1 apresentou teores elevados de sólidos solúveis e carotenoides, sendo classificada como abóbora supermadura, e a abóbora 2 apresentou teores consideráveis de sólidos solúveis e carotenoides, sendo considerada madura, provavelmente não apresentavam teores significativos de clorofila. Além disso, como supracitado, na seção 6.2.1, foram encontrados baixos teores de lipídios nas abóboras estudadas. Portanto, a utilização da etapa de saponificação não traria benefícios, pois os carotenoides existentes poderiam ser degradados (hidrólise de ésteres de carotenoides, condensação aldólica e, conseqüentemente, formação de produtos indesejáveis, como isômeros *cis* e epóxidos) pelas condições do meio e o benefício de eliminação de lipídios e clorofila, explicados anteriormente, não aconteceria de forma a justificar a perda dos carotenoides promovida pelas drásticas condições do procedimento (KIMURA, RODRIGUEZ-AMAYA, GODOY, 1990).

6.2.4 Retenção real (%RR) de carotenoides totais, α - e β -carotenos

Embora não tenha sido previsto o cálculo da retenção dos carotenoides (totais, α -caroteno e todo-*E*- β -caroteno), o percentual em cada amostra analisada (cozida em imersão em água e no vapor) encontra-se na tabela 5.

A retenção real dos carotenoides totais variou de 105,62 a 119,73%, do α -caroteno de 101,18 a 116,21% e do todo-*E*- β -caroteno foi de 102,45 a 122,81%, tendo sido todos acima de 100%.

Tabela 5: Percentual de retenção real de carotenoides totais, α - e todo-*E*- β -caroteno (%) das amostras de *C. moschata* cozidas por imersão em água e no vapor.

Abóboras	Preparações	% Retenção Real		
		Carotenoides Totais (%)	α -caroteno (%)	Todo- <i>E</i> - β -caroteno (%)
1	Imersão	107,32 ^a ± 0,37	102,00 ^a ± 0,29	102,45 ^a ± 0,29
	Vapor	111,78 ^b ± 0,68	109,85 ^b ± 1,80	106,45 ^a ± 1,74
2	Imersão	105,62 ^c ± 0,58	101,18 ^a ± 3,56	104,87 ^a ± 3,69
	Vapor	119,73 ^d ± 0,00	116,21 ^b ± 0,05	122,81 ^b ± 0,06

Cada valor corresponde à média ± desvio padrão, em triplicata.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo pós-teste Tukey.

Em ambas as abóboras o processo de cozimento no vapor apresentou retenção dos carotenoides totais, α -caroteno e todo-*E*- β -caroteno mais elevada, com exceção das retenções do todo-*E*- β -caroteno da abóbora 1, que não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os cozimentos em imersão e no vapor. Portanto, acredita-se que o cozimento no vapor proporcionou maior disponibilidade de carotenoides.

Dietz, Kantha e Erdman Jr. (1988) avaliaram diversos vegetais cozidos em imersão e no vapor. O espinafre apresentou retenção de β -caroteno de 112% após o cozimento em água à ebulição e 132% no vapor, enquanto que na cenoura foi inferior (60% e 99% - ebulição e vapor, respectivamente). Os resultados da presente dissertação corroboram àqueles dos autores, em que o cozimento no vapor apresentou retenções mais elevadas.

No Paquistão, Nagra e Khan (1988) avaliaram vários vegetais, dentre os quais abóboras (espécie não especificada) cozidas por 1 hora, encontrando retenções de β -caroteno de apenas 50% na abóbora e 75% no espinafre. Estes valores foram inferiores àqueles reportados na presente dissertação, entretanto, o tempo de cozimento foi demasiadamente superior. Adicionalmente, Neves (2011) também encontrou percentuais de retenção em *C. moschata*, inferiores (80,89 a 98,02%) aos encontrados na presente dissertação.

6.2.5 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais se faz importante, tendo em vista que vários estudos têm demonstrado que são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais (WANG, CAO, PRIOR, 1996; KAHKONEN *et al.*, 1999).

Em estudo realizado por Melo e colaboradores (2008), o uso da água (100%) no processo de extração de compostos fenólicos possibilitou a extração de um maior teor destes compostos em 14 de 15 frutas avaliadas, com exceção apenas da pinha, que apresentou maiores teores de polifenóis quando extraída com acetona. Por isso, o solvente utilizado para a extração dos fenólicos totais no presente estudo foi a água.

Na figura 27, pode-se observar a curva de calibração do padrão ácido gálico obtida para a determinação dos compostos fenólicos totais das amostras de abóbora da presente dissertação.

A equação da reta ($y = 22,635x - 0,0348$) foi utilizada para o cálculo dos compostos fenólicos totais como equivalentes de ácido gálico- EAG (mg AG/ g amostra) nas diferentes amostras. O coeficiente de determinação (R^2) entre x e y , no valor de 0,9985, comprovou a correlação positiva entre a massa de ácido gálico (mg) e a absorbância (760 nm).

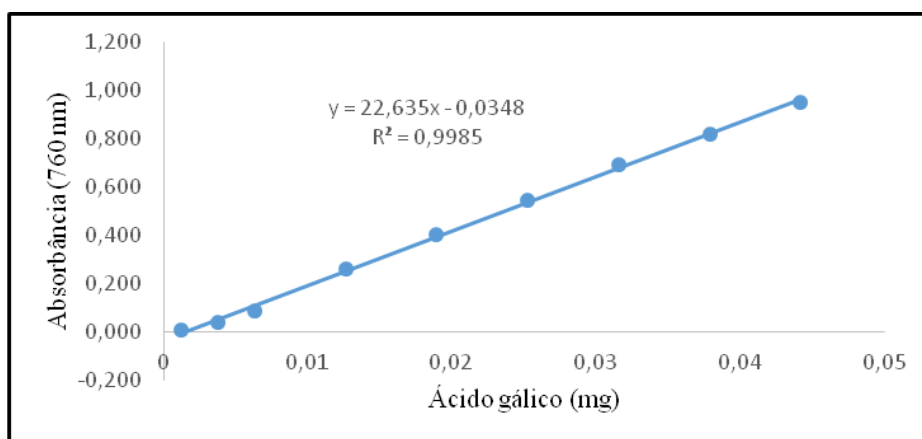


Figura 27: Curva padrão de ácido gálico no ensaio para quantificação de fenólicos totais.

O conteúdo de compostos fenólicos totais encontrados nas amostras liofilizadas das abóboras (e nas diferentes preparações) encontra-se na tabela 6. Os resultados foram apresentados em matéria seca (liofilizada) para facilitar a comparação entre as amostras, visto que apresentam diferentes teores de umidade (TURKMEN, SARI, VELIOGLU, 2005). Além disso, o processo de liofilização possibilita melhor conservação da amostra e por mais tempo, por isso foi realizado (MARTINS *et al.*, 2011).

Tabela 6: Conteúdo de fenólicos totais das abóboras 1 e 2 e preparações (em mg de ácido gálico/ g de amostra seca).

Abóbora	Preparação	Fenólicos totais (mg EAG/ g amostra)
1	Crua	3,07 ± 0,11 ^a
	Cozida em imersão	1,70 ± 0,04 ^b
	Cozida no vapor	1,75 ± 0,01 ^b
2	Crua	4,10 ± 0,01 ^c
	Cozida em imersão	3,14 ± 0,01 ^a
	Cozida no vapor	3,10 ± 0,01 ^a

Cada valor corresponde à média ± desvio padrão, em triplicata.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo pós-teste Tukey.

Quando comparadas as mesmas preparações entre as abóboras, o conteúdo de fenólicos totais da abóbora 2 foi superior ao da abóbora 1. Para ambas as abóboras o conteúdo foi mais elevado nas amostras cruas do que nas cozidas, tanto quando cozidas no vapor quanto em imersão, não havendo diferença significativa entre as preparações cozidas da mesma abóbora ($p < 0,05$).

Como pode ser observado no quadro 4, a literatura relata conteúdo de fenólicos semelhante ao encontrado para a abóbora 2 (crua) para a mesma espécie (JACOBO-VALENZUELA *et al.*, 2011). Adicionalmente, Turkmen, Sari e Velioglu (2005) reportaram teores mais elevados de compostos fenólicos em abóboras do que os encontrados na presente dissertação. Entretanto, não foi descrita a espécie de abóbora utilizada. Apesar disso, relataram perdas de compostos fenólicos em diferentes métodos de cozimento (em imersão, no vapor e em micro-ondas), o que corrobora os resultados obtidos com as abóboras 1 e 2. Os mesmos autores, ao compararem amostras cozidas, não observaram diferença significativa ($p < 0,05$), bem como no presente estudo.

Tiveron (2010), por sua vez, encontrou valor inferior em abóbora da espécie *C. maxima* crua. Entretanto, o valor, embora avaliado na amostra crua, foi semelhante aos das abóboras cozidas desse estudo.

Observando-se o quadro 4, verifica-se que o milho *in natura* também apresentou valor semelhante ao da abóbora 2 crua (ASAMI *et al.*, 2003), enquanto que o valor encontrado na abóbora 1 crua foi semelhante ao reportado para o tomate por Vasco, Ruales, Kamal- Eldin (2008).

As amostras cozidas (abóbora 1) apresentaram conteúdo de fenólicos totais semelhante ao encontrado em ervilhas cozidas, que também revelaram redução do conteúdo de fenólicos após seu cozimento, não apresentando diferença significativa, ao mesmo nível de significância, entre as amostras cozidas (TURKMEN, SARI, VELIOGLU, 2005).

Azizah e colaboradores (2009) reportaram o mesmo comportamento ao avaliarem abóboras *C. moschata* cruas, cozidas e fritas em diferentes tempos de cocção. Quanto maior o tempo de cozimento em imersão e fritura, menores foram os teores de compostos fenólicos totais.

A diminuição do conteúdo de compostos fenólicos com o cozimento ocorreu, provavelmente, devido à ruptura da estrutura dos fenólicos durante o processo (CROZIER *et al.*, 1997).

Quadro 4: Fenólicos totais (em mg de ácido gálico/ g amostra seca) reportados na literatura em vegetais crus e cozidos.

Amostra*	Fenólicos totais (mg EAG/ g amostra seca)	Fonte
Abóbora (<i>C. moschata</i>)	4,77	Jacobo-Valenzuela <i>et al.</i> (2011)
Abóbora**	8,33	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Abóbora** (cozida em imersão)	4,97	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Abóbora** (cozida no vapor)	5,81	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Abóbora** (cozida em microondas)	5,56	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Tomate	3,71	Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008)
Milho	aprox. 3,91	Asami <i>et al.</i> (2003)
Ervilha	1,83	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Ervilha (cozida em imersão)	1,39	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Ervilha (cozida no vapor)	1,60	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Ervilha (cozida em micro-ondas)	1,52	Turkmen, Sari e Velioglu (2005)
Abóbora (<i>C. maxima</i>)	1,6	Tiveron (2010)

*As amostras cujo tipo de cozimento não está descrito são cruas.

** Não foi especificada a espécie da abóbora.

6.2.6 Atividade antioxidante

6.2.6.1 Método DPPH

Pode-se observar, na figura 28, a curva de calibração do padrão ácido gálico. Foram utilizadas 11 concentrações diferentes do padrão para a elaboração da curva. O coeficiente de determinação (R^2) entre x e y , no valor de 0,998, indicou correlação positiva entre a concentração de ácido gálico e a absorbância (517 nm).

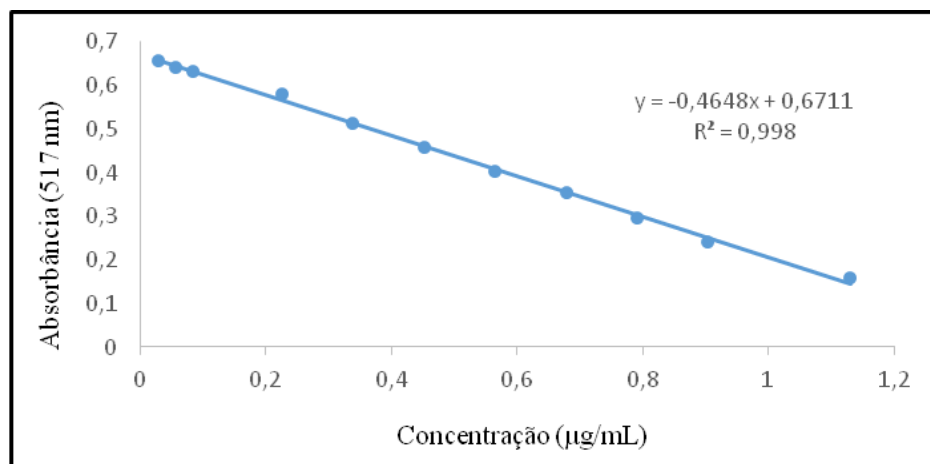


Figura 28: Curva padrão de ácido gálico frente ao radical livre DPPH.

Foram testados vários tempos de análise para este método, porém o de 90 minutos foi o que resultou em maior atividade de sequestro do radical. Tempos mais longos a partir de 90 minutos apresentaram valores de absorbância superiores, o que indica menor sequestro do radical.

Na Tabela 7, são apresentados os percentuais de sequestro (% sequestro) do DPPH nos extratos das amostras de abóbora *C. moschata* e nas diferentes preparações (concentração de 0,01 g/mL) e, na tabela 8, o percentual de sequestro do padrão ácido gálico (em concentrações bem inferiores, expressas em µg/mL). Vale ressaltar que a concentração do extrato de abóbora leva em consideração toda a amostra liofilizada utilizada, e não apenas compostos ativos presentes no mesmo e que foram extraídos. Como trata-se de um material fibroso, esse fato deve ser considerado, visto que a maior parte do liofilizado foi descartado após a realização da extração. No caso do ácido gálico, o mesmo é totalmente solúvel em metanol, portanto deve ser considerada a sua concentração como um todo.

Tabela 7: Capacidade antioxidante dos extratos metanólicos (concentração de 0,01 g/mL) das abóboras 1 e 2 (cruas, cozidas em imersão e no vapor) no ensaio DPPH.

Abóbora	Preparação	Concentração extrato (g/mL)	% Sequestro
1	Crua	0,01	3,91 ± 0,09 ^a
	Imersão		6,01 ± 0,23 ^b
	Vapor		5,46 ± 0,26 ^c
2	Crua		4,20 ± 0,09 ^a
	Imersão		5,06 ± 0,23 ^c
	Vapor		5,41 ± 0,17 ^c

Tabela 8: Capacidade antioxidante das diferentes concentrações de ácido gálico (em metanol) no ensaio DPPH.

Concentração de ácido gálico (µg/mL)	% Sequestro
0,028	1,10 ± 0,23
0,057	3,61 ± 0,23
0,085	5,01 ± 0,69
0,226	12,88 ± 0,60
0,339	22,75 ± 0,71
0,452	31,11 ± 1,28
0,565	39,18 ± 0,40
0,678	46,64 ± 0,09
0,791	55,51 ± 1,13
0,904	63,88 ± 0,17
1,130	75,90 ± 0,15

O percentual de sequestro do DPPH variou de 3,91 a 6,01% nas diferentes amostras de abóbora avaliadas. Os menores valores foram encontrados nas amostras cruas. De uma forma geral, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as mesmas preparações das abóboras 1 e 2. Inclusive, entre amostras cozidas no vapor e imersão das duas abóboras, com exceção da abóbora 1 cozida em imersão, que apresentou valor superior ao cozimento em vapor da mesma abóbora e o cozimento em imersão e vapor da abóbora 2.

Os extratos das diferentes preparações de abóbora (0,01 g de abóbora liofilizada/mL de solução) foram equivalentes a concentrações de ácido gálico entre 0,07 e 0,10 µg/mL.

Assim como na presente dissertação, Azizah e colaboradores (2009) relataram valores superiores para a atividade antioxidante da abóbora *C. moschata* cozida em relação à crua pelo método DPPH. Entretanto, os valores não são comparáveis com os obtidos no presente estudo, tendo em vista que os extratos foram preparados a partir da amostra *in natura*, e não seca (por liofilização ou em estufa).

Melo e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antioxidante pelo DPPH de vegetais cozidos no vapor. No caso do jerimum (espécie não informada), a concentração do extrato foi 48 vezes superior ao que utilizamos. Como esperado, encontraram percentual de sequestro superior ao reportado no presente estudo (aproximadamente 35% contra 5,41 e 5,46%). O extrato de jerimum exibiu a mais baixa capacidade de sequestro dentre os vegetais comparados, não diferindo estatisticamente da vagem e da cebola branca, enquanto que o espinafre, a cenoura, a couve-folha e a couve-flor, cozidos no vapor, exibiram capacidade elevada de sequestro do radical DPPH.

Turkmen, Sari e Velioglu (2005) também analisaram vários vegetais e diferentes métodos de cozimento, incluindo a abóbora (espécie não informada). A abóbora apresentou percentual de sequestro variando entre 15,8 e 26,0% (crua, cozida em imersão, vapor e micro-ondas), entretanto, não houve diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). A concentração final da abóbora (base seca) que foi utilizada na reação com a solução de DPPH foi seis vezes superior à utilizada no presente estudo. Provavelmente este fato explica os valores mais elevados.

Extratos em metanol de 30 plantas de interesse comercial foram avaliados quanto à atividade antioxidante por diferentes métodos. No ensaio utilizando o radical DPPH, os resultados (em % de sequestro) variaram de 0,19% (*Salvia sclarea*) a 94,51% (*Pinus maritima*). Não foram fornecidas as concentrações dos extratos. Na preparação dos extratos foram extraídos compostos fenólicos que, posteriormente, foram solubilizados em metanol (DUDONNÉ *et al.*, 2009).

Segundo Kaur e Kapoor (2001), o método DPPH é menos sensível que outros métodos para antioxidantes hidrofílicos. A interação de um antioxidante com o radical DPPH depende da sua conformação estrutural. Portanto, esse método pode não fornecer a capacidade antioxidante total de um sistema.

Melo e colaboradores (2006) observaram que o teor de fenólicos totais e o percentual de sequestro do radical DPPH de extratos de frutas apresentaram uma fraca correlação. Na análise de regressão ($p < 0,05$), evidenciou-se que não houve um aumento linear da capacidade de sequestrar o radical DPPH em função do teor de fenólicos totais.

6.2.6.2 Método da captura do radical livre ABTS^{•+}

Foi realizado o controle do radical ABTS^{•+} gerado e utilizado neste ensaio, a fim de verificar a sua estabilidade ao longo do tempo de análise (30 minutos). Como pode ser observado na figura 29, o radical permaneceu estável durante todo o tempo de análise (30 minutos).

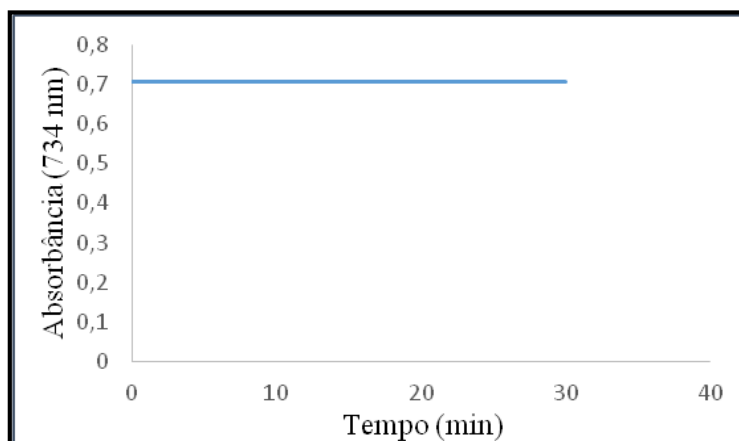


Figura 29: Estabilidade do radical ABTS^{•+} em função do tempo, a 734 nm.

A coloração da solução do radical ABTS^{•+} é azul esverdeada e a sua descoloração pode ser visualizada na figura 30.

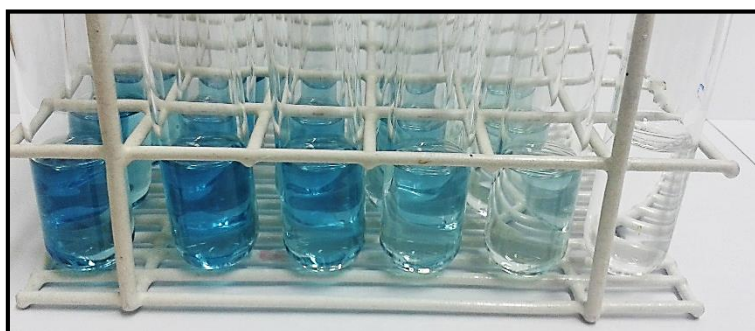


Figura 30: Imagem fotográfica da solução do radical ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do padrão trolox. A concentração de trolox nos tubos aumenta da esquerda para a direita, sendo que o último tubo (da direita) contém apenas etanol (branco).

Como esta metodologia está diretamente relacionada ao padrão trolox, os resultados foram calculados em função do mesmo. Cada concentração de trolox e respectivas absorbâncias possibilitaram a construção de curvas-padrão nos três experimentos realizados (figura 31). A equação da reta foi utilizada para o cálculo da atividade antioxidante total, expressa em μM

trolox/g amostra nas diferentes amostras. Os coeficientes de determinação (R^2) entre x e y , de 0,9987 a 0,9994, comprovaram a correlação positiva entre a concentração de trolox e a absorvância (734 nm).

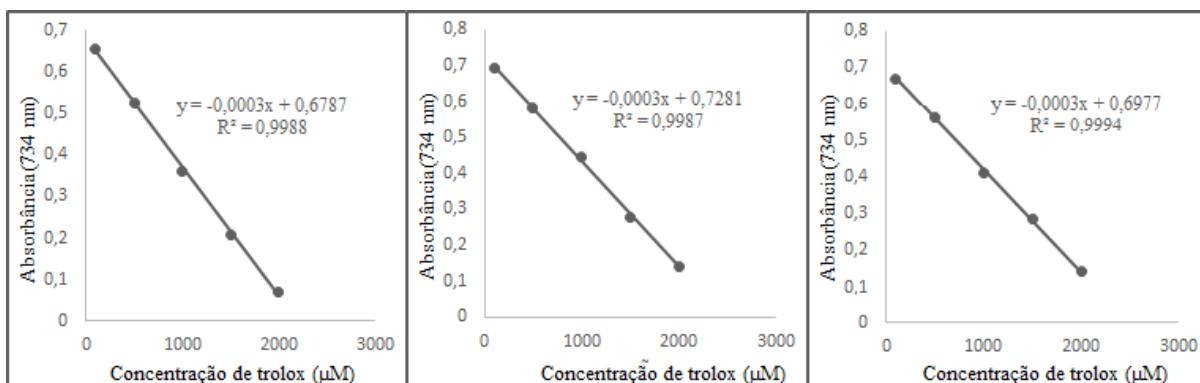


Figura 31: Curvas padrão de trolox frente ao ABTS nos três ensaios realizados.

As imagens fotográficas das diferentes concentrações das amostras em tubos com o radical encontram-se ilustradas nas figuras 32 (abóbora 1) e 33 (abóbora 2). Pode-se observar que não ocorreu descoloração visual acentuada da solução em relação às diferentes preparações, mesmo em diferentes concentrações.

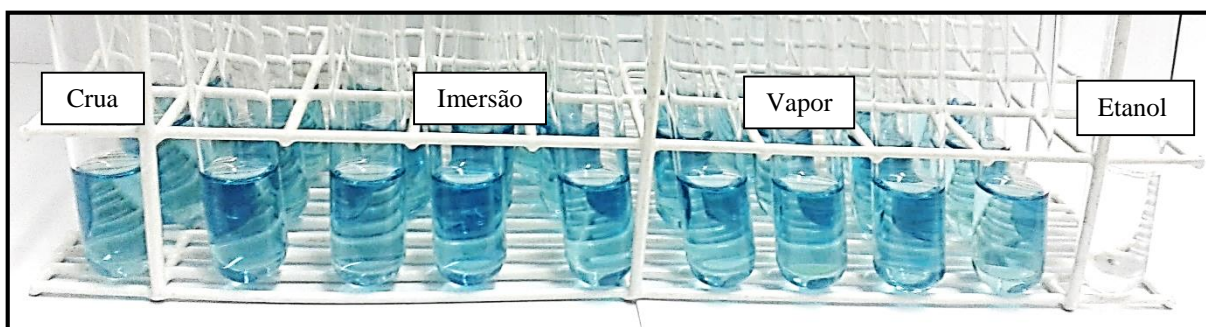


Figura 32: Imagem fotográfica da descoloração do radical ABTS^+ utilizando as preparações da abóbora 1, cada uma em três diferentes concentrações (da esquerda para a direita: 3333,33 mg/L; 6666,66 mg/L e 10000 mg/L) e o branco (etanol).

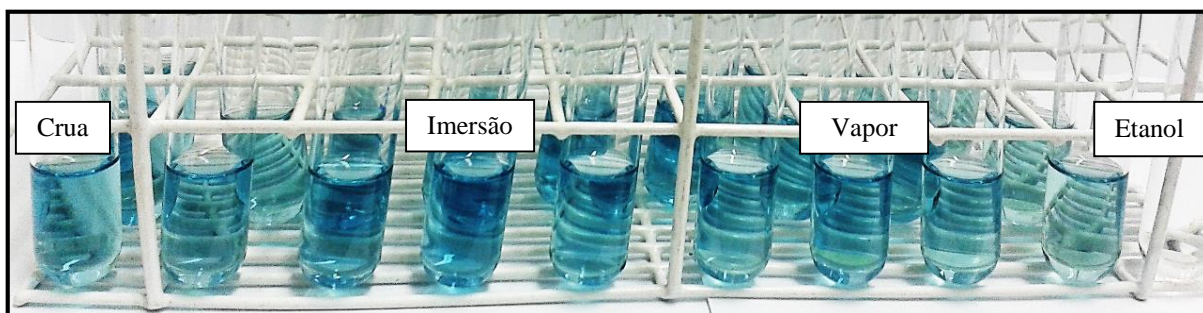


Figura 33: Imagem fotográfica da descoloração do radical $ABTS^{+}$ utilizando as preparações da abóbora 2, cada uma em três diferentes concentrações (da esquerda para a direita: 3333,33 mg/L; 6666,66 mg/L e 10000 mg/L) e o branco (etanol).

Na tabela 9 são apresentados os valores médios das atividades antioxidantes obtidas pelo método ABTS em função da curva padrão de trolox. As médias dos resultados para as preparações da abóbora 1 variaram de 22,89 (cozida em imersão) a 24,79 μM trolox/ g amostra (crua), enquanto que na abóbora 2 houve variação de 34,15 (cozida em imersão) a 35,05 μM trolox/ g (cozida no vapor). Entretanto, não houve diferença significativa entre as preparações na mesma abóbora. A abóbora 2 apresentou atividade antioxidante superior à abóbora 1.

Tabela 9: Capacidade antioxidante das abóboras 1 e 2 cruas e nas diferentes preparações, frente ao trolox, no ensaio ABTS (base seca).

Abóbora	Preparação	Atividade antioxidante (μM trolox/g amostra)
1	Crua	$24,79 \pm 3,03^a$
	Cozida em imersão	$22,89 \pm 1,01^a$
	Cozida no vapor	$23,83 \pm 1,78^a$
2	Crua	$34,56 \pm 1,39^b$
	Cozida em imersão	$34,15 \pm 1,30^b$
	Cozida no vapor	$35,05 \pm 2,76^b$

Cada valor corresponde à média \pm desvio padrão, em triplicata.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo pós-teste Tukey.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram reportados por Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008) em frutos como a ameixa e o morango, sendo de aproximadamente 35 e 20 μM trolox/g de amostra, respectivamente. Porém, estes autores reportaram também valores superiores para frutos como o maracujá (*Passiflora mollissima*), com aproximadamente 110 μM trolox/g amostra e a goiaba (40 μM trolox/g amostra). A manga apresentou valor inferior (5 μM trolox/g amostra).

Zhou e Yu (2006) reportaram valores para atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS de vários vegetais, os quais podem ser observados no quadro 5.

Quadro 5: Atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS de diferentes vegetais

Atividade Antioxidante Total (μM trolox/ g amostra seca)							
Tomates	Batatas	Cenouras	Vagens	Espinafres	Couves	Brócolis	Ruibarbo
5,4 a 20,9	2,3 a 9,9	Aprox. 4 a 7	Aprox. 28 a 30	Aprox. 35 a 50	Aprox. 40 a 59	Aprox. 34 a 40	Aprox.. 37

Fonte: (ZHOU, YU, 2006)

Os tomates, batatas e cenouras apresentaram valores inferiores aos das abóboras da presente dissertação. Nenhum vegetal apresentou valor semelhante aos encontrados para a abóbora 1, sendo o que mais se aproximou foi a vagem. Entretanto, os brócolis e o ruibarbo apresentaram valores semelhantes aos da abóbora 2, enquanto que as couves apresentaram valores muito superiores, bem como os espinafres.

Tiveron (2010) reportou atividade antioxidante total de $12,7 \mu\text{M}$ trolox/ g abóbora liofilizada (*C. maxima*), sendo que este resultado representa metade do encontrado neste estudo para a abóbora 1 e é cerca de três vezes menor que o da abóbora 2. Vale salientar que o extrato utilizado pelos autores foi preparado com solução etanólica 80%, enquanto no presente estudo foi utilizado o metanol como solvente. Além disso, a abóbora era de espécie diferente (*C. maxima*). Essas diferenças podem justificar a diferença encontrada nos resultados.

Amariz e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante de acessos de abóbora pelo método ABTS, encontrando resultados variando entre 32,89 e 84,93 μM trolox/ g de polpa. Estes valores são bem superiores aos encontrados no presente estudo, principalmente por tratar-se de polpa íntegra, e não liofilizada. No entanto, o trabalho não apresenta as condições em que o ensaio foi realizado. Portanto, não contribui para a discussão a respeito das diferenças encontradas.

O método ABTS apresenta como vantagens o fato de apresentar os resultados expressos sempre em relação a uma quantidade específica de amostra (sempre em relação a 1 grama de amostra) e, também, de utilizar sempre o mesmo padrão (trolox), o que contribui para a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos, nos quais sejam utilizados extratos com concentrações diferentes.

6.2.6.3 Sistema β -caroteno/ ácido linoleico

Na figura 34 encontra-se a cinética do potencial antioxidante (% de inibição) dos extratos de abóboras e preparações analisadas em diferentes volumes (25, 100 e 400 μ L) pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico. O acompanhamento da atividade foi realizado em intervalos de 20 min, durante 120 min.

Como esperado, o controle (CONT.) (sem antioxidante) foi o que apresentou maior decaimento desde o início da análise. Nos 20 minutos iniciais, em um volume de 400 μ L, as abóboras 1 crua e cozidas em imersão e no vapor (1c.400, 1i.400 e 1v.400, respectivamente) apresentaram maior capacidade de proteção do sistema contra a oxidação. A inibição da oxidação foi maior, inclusive, que o padrão trolox no mesmo volume (T.400), embora o padrão seja em concentração consideravelmente menor. A mesma abóbora (1) cozida em imersão (1i.400) e no mesmo volume de extrato, surpreendentemente, preservou melhor o sistema da oxidação do que o padrão (T.400) nos primeiros 100 minutos. Após este período, o comportamento dos dois (1i.400 e T.400) foi semelhante.

Na análise da cinética apresentada pela amostra da abóbora 2, pode-se verificar que nenhuma amostra apresentou taxa de decaimento inferior ao trolox nos maiores volumes do padrão testados (T.200 e T.400). O comportamento das amostras com 25 μ L (2c.25, 2i.25 e 2v.25) foi semelhante ao trolox no mesmo volume (T.25).

Entretanto, vale ressaltar que a atividade antioxidante (expressa em percentual de inibição da oxidação) é calculada levando-se em consideração apenas a absorbância no tempo zero e no tempo final (120 minutos). Portanto, o comportamento das amostras ao longo do tempo não é levado em consideração, revelando-se de grande importância a observação da cinética do comportamento das amostras e a comparação com o padrão frente ao sistema, o que já revela uma diferença entre as amostras, visto que houve um tempo para que todas as leituras fossem executadas. Intervalos no preparo dos tubos com as amostras e o sistema para compensar o tempo dispendido na leitura não foram realizados, pois o sistema já se encontrava em condições que estimulavam a oxidação. Quanto maior o tempo gasto, mais oxidado o sistema e menos comparáveis seriam os resultados das leituras das absorbâncias.

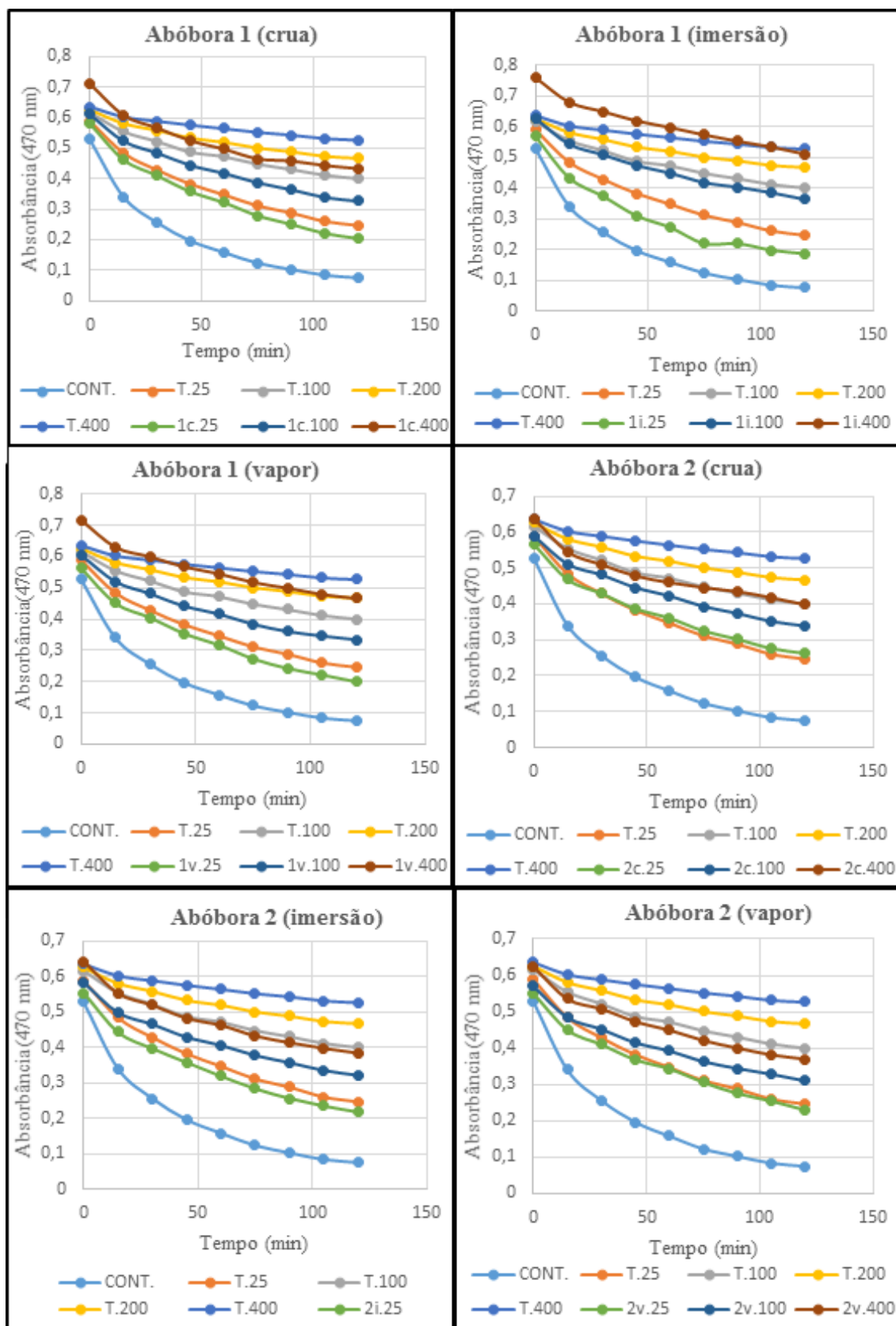


Figura 34: Cinética do potencial antioxidante dos extratos em metanol das abóboras 1 e 2 (a 0,01 g/mL) e as preparações cruas (1c e 2c), cozidas em imersão (1i e 2i) e cozidas no vapor (1v e 2v) em diferentes volumes de solução (25, 100 e 400 μ L); diferentes volumes do padrão trolox: 25 μ L (T.25), 100 μ L (T.100), 200 μ L (T.200) e 400 μ L (T.400) a 0,2 mg/mL e o controle (CONT.).

A capacidade antioxidante dos extratos das abóboras 1 e 2, cruas e cozidas (em imersão e no vapor), em inibir a oxidação do sistema β -caroteno/ ácido linoleico, submetido a condições que propiciam a oxidação, encontra-se apresentada na tabela 10.

Tabela 10: Atividade antioxidante (porcentagem de inibição da oxidação) de diferentes volumes dos extratos das abóboras 1 e 2 cruas e cozidas (em imersão e no vapor) e do padrão trolox (em metanol) pelo método sistema β -caroteno/ ácido linoleico.

Amostras	% de inibição da oxidação			
	25 μ L	100 μ L	200 μ L	400 μ L
Trolox (200 ppm)*	24,39 ^{a,1} (\pm 1,09)	52,21 ^{a,2} (\pm 0,16)	64,90 ³ (\pm 0,15)	75,83 ^{a,4} (\pm 0,16)
Abóbora 1 (0,01 g/mL)*	Crua	16,88 ^{b,1} (\pm 0,01)	37,15 ^{b,2} (\pm 0,21)	-
	Imersão	15,78 ^{b,1} (\pm 0,16)	41,72 ^{c,2} (\pm 0,01)	-
	Vapor	19,65 ^{c,1} (\pm 0,31)	40,18 ^{d,2} (\pm 0,31)	-
Abóbora 2 (0,01 g/mL)*	Crua	32,90 ^{d,1} (\pm 0,03)	44,59 ^{e,2} (\pm 0,29)	-
	Imersão	25,61 ^{a,1} (\pm 0,31)	42,16 ^{c,2} (\pm 0,30)	-
	Vapor	29,14 ^{e,1} (\pm 0,03)	42,60 ^{c,2} (\pm 0,31)	-

Valores das médias das triplicatas \pm desvio-padrão.

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$), comparando as amostras e o padrão trolox.

¹²³ Médias na mesma linha seguidas de números diferentes diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$), diferentes volumes das mesmas amostras.

* As concentrações da solução de partida do padrão e dos extratos de abóbora estão em unidades diferentes.

Pode-se observar na tabela 10 que os percentuais de inibição da oxidação dos extratos de abóbora são significativamente menores que os obtidos com o padrão trolox empregado nos mesmos volumes, porém ainda em concentração bem inferior.

No menor volume de extrato avaliado (25 μ L), a abóbora 2 apresentou maior atividade antioxidante do que a abóbora 1. Entretanto, as diferentes preparações não tiveram o mesmo comportamento ao se comparar as duas amostras de abóbora. Na abóbora 1, os resultados não diferiram na amostra crua e na cozida em imersão, porém houve diferença significativa na mesma abóbora cozida no vapor, enquanto que na abóbora 2, a ordem crescente de atividade antioxidante foi: imersão < vapor < crua.

Quando se avaliou o volume intermediário (100 µL) e o maior (400 µL) de extrato utilizado na análise, o comportamento foi diferente do encontrado para o menor volume (25 µL). Em ambos os casos, na abóbora 1, as amostras cozidas apresentaram maior atividade (100 µL: crua < vapor < imersão e a 400 µL: crua < vapor = imersão) enquanto que, na abóbora 2, ocorreu com a amostra crua (100 µL: imersão = vapor < crua e a 400 µL: imersão < vapor << crua).

No entanto, ao se comparar estatisticamente os valores obtidos para os três volumes estudados (mesma abóbora e preparação), a atividade antioxidante das amostras aumentou com o aumento do volume, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas, excetuando-se a abóbora 2, cozida em imersão, nos volumes de 100 e de 400 µL.

Apesar de ter havido diferença significativa entre as concentrações, nos volumes 100 e 400 µL houve sempre comportamentos mais semelhantes. Tendo em vista os resultados observados, aqueles encontrados para o menor volume (25 µL) não foram considerados para a discussão.

Volumes superiores a 400 µL apresentaram atividade cada vez menor (resultados não apresentados) no tempo final da reação (2 horas). No início, conforme esperado, ocorreu maior inibição da oxidação (as absorvâncias iniciais foram maiores que as referentes aos volumes menores de extrato), provavelmente devido a uma possível interferência da cor amarelada dos extratos (mais intensa em maiores concentrações) com a cor do sistema (LAGOURI, BOSKOU, 1995).

De acordo com a classificação proposta por Melo e colaboradores (2006), percentuais de proteção acima de 70% indicam produtos com elevada atividade, entre 50 e 70% possuem ação moderada e abaixo de 50% fraca. Se esta classificação fosse considerada, todos os extratos de abóbora em todos os volumes utilizados apresentar-se-iam como de baixa atividade antioxidante. Entretanto, os extratos utilizados nesse estudo foram mais concentrados do que os utilizados no presente estudo. Além disso, houve diferenças na metodologia empregada, dentre as quais a utilização de água não oxigenada, o uso do Tween 20 (em vez do Tween 40) e o tempo de análise inferior (105 minutos).

Melo e colaboradores (2009) verificaram a atividade antioxidante de vegetais cozidos no vapor e encontraram atividade antioxidante maior do que 70% no extrato metanólico de jerimum (espécie não especificada) e de brócolis nas concentrações de 0,16 g/mL e 0,02 g/mL, respectivamente. O extrato de abóbora utilizado era 16 vezes mais concentrado que o utilizado no presente estudo e, no ensaio do DPPH, apresentou atividade antioxidante bem reduzida entre os vegetais avaliados. Tendo em vista que o teor de carotenoides não foi avaliado nas amostras,

é possível que os mesmos fossem baixos, tendo sua cor não interferido na análise. Entretanto, Melo e colaboradores (2006), ao avaliarem a capacidade antioxidante de vegetais crus, encontraram valores bem diferentes dos reportados quando em experimentos com hortaliças cozidas no vapor, no estudo de 2009. A abóbora não foi avaliada em 2006, mas várias hortaliças que foram abordadas em ambos os estudos apresentaram capacidade antioxidante diferenciada. Portanto, deve ser considerado que os vegetais utilizados não foram os mesmos, embora da mesma espécie, podendo haver interferências como a variação de cultivar, variedade, estágio de maturação, condições climáticas, entre outros parâmetros. Segundo os autores, o processo de cozimento (vapor) possivelmente exerceu algum efeito sobre os compostos bioativos de modo a justificar as diferenças encontradas entre esses dois estudos.

Alguns eventos que ocorrem durante os processos de cozimento das hortaliças podem justificar a alteração de sua atividade antioxidante. De acordo com Turkmen, Sari e Velioglu (2005), o calor empregado nos processos de cozimento é suficiente para tornar inativas algumas peroxidases que atuam como pró-oxidantes. Por outro lado, o cozimento pode favorecer a formação de novos compostos, como os produtos da reação de Maillard (PRM), que apresentam atividade antioxidante (e também antimutagênica). De acordo com Vhangani e Wyk (2013), os PRMs apresentam a atividade antioxidante através dos processos de transferência de elétrons, doação de átomos de hidrogênio e por quelação indireta de metais. Apesar disso, o consumo dos PRMs pode diminuir a biodisponibilidade de minerais e o valor biológico de proteínas, visto que ao longo da reação há comprometimento de resíduos de aminoácidos essenciais, com consequentes alterações da estrutura proteica ou, até mesmo, inibição de enzimas digestivas. Entretanto, métodos mais brandos de cozimento e com alta atividade de água, como cozimentos em imersão e a vapor, que é o caso deste estudo, geram teores menores de PRM (SHIBAO, BASTOS, 2011).

Sultana, Anwar e Iqbal (2008), avaliando hortaliças cozidas em imersão, fritura e micro-ondas, constataram que o método de cocção empregado, além de propiciar a formação de novos compostos com ação antioxidante, pode ainda favorecer a extração ou, ao contrário, a destruição de compostos bioativos.

Segundo Amariz e colaboradores (2012), como em abóboras os compostos bioativos predominantes são os carotenoides, que possuem natureza lipofílica, o método mais adequado para detecção de sua capacidade antioxidante seria o sistema β -caroteno/ ácido linoleico, pois apesar de o método de captura do radical ABTS ser amplamente utilizado em hortaliças, é bastante abrangente, devido à sua natureza lipofílica e hidrofílica. Entretanto, conforme apresentado no presente estudo, as abóboras também possuem compostos fenólicos, que

possuem características hidrofílicas. No estudo de Amariz e colaboradores (2012) foram reportados valores de percentual de proteção entre 60,18 e 86,65%. Apesar disso, não foi reportada a concentração do extrato utilizado, o que impede uma melhor avaliação crítica e comparação com outros estudos.

Tendo em vista que a abóbora 1 apresentou teor de carotenoides mais elevados comparada à abóbora 2 e que as preparações cozidas apresentaram conteúdos mais elevados destes compostos, é possível que o comportamento apresentado no ensaio sistema β -caroteno/ácido linoleico (a atividade antioxidante da abóbora 1 cozida por ambos os métodos foi maior do que a crua) seja devido à presença destes pigmentos.

Por outro lado, a abóbora 2 apresentou conteúdo de compostos fenólicos mais elevado, especialmente na amostra crua, revelando, também, maior atividade de proteção contra a oxidação comparada às preparações cozidas da abóbora 2. Port's e colaboradores (2013) reportaram correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos totais e o sistema β -caroteno/ácido linoleico, corroborando a hipótese proposta.

6.2.6.4 Avaliação da relação entre os métodos de avaliação da atividade antioxidante e os teores de carotenoides e polifenóis

O metanol foi o solvente que propiciou a obtenção dos melhores resultados de avaliação da atividade antioxidante avaliada por Miliauskas, Venskutonis e Beek (2004), que compararam extratos em acetona, acetato de etila e metanol de 12 plantas medicinais pelos métodos DPPH e ABTS, e também Thaipong e colaboradores (2006), que compararam os extratos de goiaba, utilizando como solventes o metanol e o diclorometano. Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) também preconizaram o uso do metanol em seus estudos para avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH. Baseando-se nestes relatos, o metanol foi o solvente escolhido para extração no presente estudo. Como um dos objetivos do estudo foi comparar diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante, optou-se pela utilização do mesmo extrato para todas as análises de atividade antioxidante. Embora o metanol possa não extrair os compostos lipossolúveis com atividade antioxidante em toda a sua magnitude (FLOEGEL *et al.*, 2011), foi possível constatar a presença de carotenoides, devido à coloração alaranjada dos extratos. Além disso, a utilização de extratos mais concentrados ou de outros solventes extratores mais apolares, como a acetona e o éter etílico, gerou resultados de atividade antioxidante inferiores para o método de oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico, possivelmente devido à interferência da cor do extrato, por se assemelhar à do sistema, conforme reportado por Lagouri e Boskou (1995).

Vários autores têm demonstrado que existe uma forte relação positiva entre o teor de polifenóis e a capacidade antioxidante de frutas e hortaliças (VELIOGLU *et al.*, 1998; VINSON *et al.*, 1998; KAUR, KAPOOR, 2002; ABDILLE *et al.*, 2005), enquanto que outros evidenciam o contrário (KAHKONEN *et al.*, 1999; ISMAIL, MARJAN, FOONG, 2004). A eficácia do antioxidante está relacionada principalmente à sua estrutura química. A capacidade antioxidante de um extrato não pode ser explicada com base apenas em seu teor de fenólicos totais, mas das características dos compostos envolvidos, haja visto que a posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos compostos fenólicos são fatores relevantes para esta atividade. A *orto*-dihidroxilação, por exemplo, contribui grandemente para a capacidade antioxidante dos compostos. Portanto, a caracterização da estrutura do composto ativo também deve ser considerada. Adicionalmente, os extratos podem apresentar outras substâncias bioativas não quantificadas que podem contribuir para a atividade (HEINONEN, LEHTONEN, HOPIA, 1998; MELO *et al.*, 2006).

Wootton-Beard, Moran e Ryan (2011) e Wu e colaboradores (2004) reportaram que a capacidade antioxidante determinada por ensaios *in vitro* difere. De acordo com Dudonné e colaboradores (2009), nenhum método de mensuração da atividade antioxidante utilizado por si, somente, é suficiente. Portanto, mais de um método para a mensuração da capacidade antioxidante deve ser realizado para que sejam levados em consideração os diferentes tipos de ação dos antioxidantes.

Thaipong e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antioxidante de goiaba e também o conteúdo de compostos que contribuem para a mesma, como polifenóis, carotenoides e ácido ascórbico. A goiaba apresentou teores elevados de compostos fenólicos e de ácido ascórbico, porém baixos teores de carotenoides totais, variando de 7,8 a 29,3 µg/g de fruto. Foi encontrada alta correlação entre os teores de ácido ascórbico e polifenóis e a atividade antioxidante por todos os métodos avaliados (ABTS, DPPH, FRAP e ORAC). Entretanto, a relação entre a atividade antioxidante e os teores de carotenoides foi negativa. Em estudo realizado por Gil e colaboradores (2002), no entanto, em frutas com baixo teor de ácido ascórbico, como a nectarina, o pêssego e a ameixa, não foi encontrada correlação positiva entre os teores de ácido ascórbico e a atividade antioxidante (avaliadas por FRAP e DPPH). Thaipong e colaboradores (2006), portanto, concluíram que frutas que contenham alto teor de ácido ascórbico normalmente apresentam alta correlação entre o teor destes compostos e a atividade antioxidante avaliada por todos os métodos realizados. Porém, não foi avaliado o conteúdo de ácido ascórbico no presente estudo. Portanto, a sua possível contribuição para a atividade antioxidante das matrizes não pode ser estabelecida.

Wangcharoen e Morasuk (2007) avaliaram a atividade antioxidante por diferentes métodos, dentre os quais o DPPH e o ABTS. Neste estudo, a contribuição do conteúdo de fenólicos para os resultados do método ABTS foi maior do que a do DPPH, sugerindo que o ensaio ABTS deve ser um método preferível para a avaliação da capacidade antioxidante. Adicionalmente, Wang e colaboradores (1998) reportaram que alguns dos compostos fenólicos da *Salvia officinalis* que avaliaram (4-*O*- β -D-glicopiranosilacetofenona, (+)-1-hidroxi-pinocresinol-1- β -D-glicosídeo, homoplantaginina, 4-hidroxiacetofenona-4-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glicopiranosídeo, icarisídeo F2 e 2,3-dihidro-2-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-3-(hidroximetil)-7-metoxi-5-benzofuranopropanol 4'-*O*- β -glicopiranosídeo) possuíam atividade de sequestro do ABTS e não apresentaram atividade de sequestro do DPPH.

Além disso, Floegel e colaboradores (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de 44 alimentos conhecidos como portadores de alta atividade antioxidante nos Estados Unidos pelos métodos ABTS e DPPH. Ao correlacionar os resultados obtidos com os valores do método ORAC e conteúdos de fenólicos e flavonoides apresentados pelo USDA, sugeriram que o método ABTS reflete melhor a atividade antioxidante dos alimentos do que o DPPH, particularmente em frutas, vegetais e bebidas. Entretanto, segundo estes mesmos autores, deve ser levado em consideração que os métodos ABTS e DPPH são modelos *in vitro* e não acessam toda a atividade antioxidante em alimentos. Adicionalmente, Kim e colaboradores (2003) observaram que a capacidade antioxidante medida pelo ensaio ABTS foi altamente correlacionada com o conteúdo de compostos fenólicos em ameixas, principalmente os fenólicos não-flavonoídicos.

Na presente dissertação, a abóbora 2 foi a que apresentou o maior teor de compostos fenólicos e também a maior atividade pelo método ABTS. Com relação à atividade avaliada pelo método DPPH, não houve diferença entre as abóboras. Entretanto, ao contrário dos resultados obtidos para fenólicos totais, para os quais as amostras cruas apresentaram maiores teores, no método DPPH as abóboras cozidas apresentaram maior atividade antioxidante. Portanto, não houve correlação positiva entre essas avaliações. Entretanto, assim como na avaliação de carotenoides totais, as abóboras cozidas apresentaram maior atividade do que as cruas. Pode ser que estes compostos tenham contribuído mais efetivamente para a atividade, mas não tenha havido maior resposta ou diferença entre as abóboras 1 e 2 devido à extração ineficiente de carotenoides (apolares) pelo metanol (solvente polar).

Ao investigarem a capacidade de inibição da oxidação de frutas pelos métodos DPPH e sistema β -caroteno/ ácido linoleico, Duarte-Almeida e colaboradores (2006) encontraram resultados muito divergentes entre os métodos utilizados, assim como os apresentados na

presente dissertação. Pelo ensaio sistema β -caroteno/ ácido linoleico, a ordem crescente de atividade antioxidante encontrada pelos autores foi a seguinte: acerola < morango < amora < açaí, sendo que a acerola também apresentou atividade pró-oxidante, enquanto que no ensaio DPPH, a ordem foi: morango < açaí < amora < acerola. Além disso, Melo e colaboradores (2006) também encontraram resultados divergentes para os ensaios DPPH e β -caroteno/ ácido linoleico realizados em extratos de frutas. Enquanto no ensaio do DPPH os extratos aquoso e acetônico da acerola exibiram a maior capacidade de sequestrar o radical, no ensaio β -caroteno/ ácido linoleico estes extratos apresentaram um dos menores percentuais de inibição da oxidação. Portanto, os métodos não apresentam resultados comparáveis.

É possível que, nos resultados obtidos para o teste sistema β -caroteno/ ácido linoleico no presente estudo, os carotenoides tenham sido os compostos que mais contribuíram para a atividade antioxidante da abóbora 1, que é a que apresenta os maiores teores destes compostos, enquanto que no caso da abóbora 2, os fenólicos totais tenham contribuído mais efetivamente para a atividade. Isso explicaria o fato de a abóbora 1 cozida ter apresentado maior atividade do que a crua e, no caso da abóbora 2, as cruas terem maior atividade.

7 CONCLUSÕES

A abóbora 1 apresentou alto conteúdo de matéria seca. Além disso, os teores de cinzas, lipídios e fibras foram maiores do que os reportados na literatura. No entanto, a abóbora 2 foi considerada como de baixo teor de matéria seca. Entretanto, apresentou alto teor de proteínas em relação a outras abóboras, porém, segundo a legislação, é um alimento com baixo teor de proteínas.

Com relação ao teor de sólidos solúveis, a abóbora 1 apresentou alto teor, sendo considerada muito madura, enquanto a 2 foi classificada como madura.

A abóbora 1 apresentou os mais elevados teores de carotenoides totais, α -caroteno, β -caroteno e isômeros 9- e 13-*cis*, provavelmente devido ao estágio de maturação mais avançado.

Após o cozimento, houve aumento de todos os carotenoides avaliados nas duas abóboras, porém o cozimento no vapor apresentou maior percentual de retenção de carotenoides.

A abóbora 2 apresentou maiores teores de fenólicos totais, os quais reduziram com o cozimento em ambas as abóboras.

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi baixa, não diferindo estatisticamente entre as abóboras 1 e 2. Porém, constatou-se que o cozimento levou a um aumento na atividade

antioxidante. Por outro lado, o método ABTS revelou maior atividade antioxidante na abóbora 2, não havendo diferença significativa entre as preparações. A atividade antioxidante das abóboras foi superior à reportada na literatura para muitos outros vegetais.

A utilização do sistema β -caroteno/ ácido linoleico revelou que a abóbora 1 cozida e a abóbora 2 crua foram as que apresentaram maior atividade antioxidante. Não foi possível comparar os resultados com os relatados na literatura devido ao fato de o extrato utilizado ter sido menos concentrado (extratos mais concentrados interferiram na análise).

Os métodos de mensuração da atividade antioxidante apresentaram perfis diferenciados de acordo com a amostra de abóbora e respectivas preparações, o que pode ser explicado pelas alterações provocadas pelo cozimento, seja degradando alguns compostos (fenólicos) ou aumentando a disponibilidade de outros (carotenoides).

Tendo em vista que cada método apresentou-se mais sensível a compostos diferentes, não foi possível afirmar que uma metodologia seja melhor que outra, uma vez que todas possuem vantagens e limitações.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tempo de cozimento (cerca de 5 minutos) das abóboras pode ter afetado a disponibilidade dos carotenoides bioativos, principalmente o de β -caroteno, bem como os compostos fenólicos. Estudos complementares (tese de doutorado de outra aluna do laboratório) estão sendo realizados em abóboras quanto à bioacessibilidade e a biodisponibilidade do β -caroteno em tempos de cozimento mais elevados a fim de verificar o que o tornará mais biodisponível. Alguns resultados já revelaram que o estudo deste parâmetro (tempo de cozimento) influenciou a sua disponibilidade. Espera-se, como consequência, que também seja observado um aumento na atividade antioxidante, mesmo em detrimento de uma possível redução dos compostos fenólicos presentes.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p. 891-896, 2005.

ABREU, W.C.; BARCELOS, M.F.P. Atividade Antioxidante Total da Polpa de Tomate Submetida ao Processamento Térmico Doméstico em Diferentes Tempos. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, 14, 2, p. 71-76, 2012.

ACOSTA-PATIÑO, J.L.; JIMÉNEZ-BALDERAS, E.; JUÁREZ-OROPEZA, M.A.; DÍAZ-ZAGOYA, J.C. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. **Journal of Ethnopharmacology**, 77, 99–101, 2001.

ALARCON-AGUILAR, F.J.; HERNANDEZ-GALICIA, E.; CAMPOS-SEPULVEDA, A.E.; XOLALPA-MOLINA S.; RIVAS-VILCHIS, J.F.; VAZQUEZ-CARRILLO, L.I.; ROMAN-RAMOS, R. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, 82, 185–189, 2002.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, São Paulo, 2010.

AMARIZ, A.; LIMA, M.A.C.; NUNES, D.E.; ALVES, R.E. Atividade antioxidante total de frutos de acessos de abóbora conservados na Embrapa Semiárido. **Horticultura brasileira**, v. 30, n. 2, p. S7094-S7099, 2012.

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

AOAC. Total Dietary Fiber Determination (Método 985.29). 18ª edição, 3ª revisão, 2010.

ARIMA, H.K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 4, p. 177-191, 1988.

ASAMI, D.K.; HONG, Y.; BARRETT, D.M.; MITCHELL, A.E. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1237-1241, 2003.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, 1997.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 55, p. 4027-4033, 2007.

AZIZAH, A.H.; WEE, K.C.; AZIZAH, O.; AZIZAH, M. Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). **International Food Research Journal**, 16, p. 45-51, 2009.

BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of calendula products. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.53, p. 241-250, 2002.

BARBOSA, G.S. Desempenho agrônômico, caracterização morfológica e polínica de linhagens de abóbora (*Cucurbita moschata*) com potencial para o lançamento de cultivares. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências e Tecnologias agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 2009. 92p.

BEN-AMOTZ, A.; LEVY, Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-*trans* β -carotene in human serum. **American Journal of Clinical Nutrition**, 63, 729-734, 1996.

BIOFORT. Rede BioFORT. Disponível em: <http://www.biofort.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=76:redebiofort&Itemid=105>. Acesso em: 02 de outubro de 2013.

BLANK, A.F.; SILVA, T.B.; MATOS, M.L.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; SILVA-MANN, R. Parâmetros genotípicos, fenotípicos e ambientais para caracteres morfológicos e agrônômicos em abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 106-111, 2013.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2006. 178p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**, v.28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56(11): 317-333, 1998.

CAMARGO FILHO, W.P.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Mercado de abóboras nas cidades de São Paulo e Buenos Aires: oportunidades de expansão. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 61-65, 2003.

CAMPOS, M.F.; SANT'ANA, H.M.P.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J.B.P. Teores de Beta-caroteno em vegetais folhosos preparados em restaurantes comerciais de Viçosa-MG. **Brazilian Journal of Food Technology**, 6(2): 163-169, 2003.

CANO, A.; HERNÁNDEZ-RUÍZ, J.; GARCIA-CÁNOVAS, F.; ACOSTA, M.; ARNAO, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. **Phytochemical Analysis**, v. 9, 196–202, 1998.

CARDOSO, F.S.N. Frutas e Hortaliças. In: KOBLITZ, M.G.B. **Matérias primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 5-24.

CARDOSO, L.S. Fotofísica de carotenoides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, 20(5): 535-540, 1997.

CARVALHO, P.G.B.; PEIXOTO, A.A.P.; FERREIRA, M.A.J.P. **Caracterização de abóboras quanto aos teores de carotenóides totais, alfa- e beta-caroteno**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 78, Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2011. 20p.

CHAVES, M.C.V.; GOUVEIA, J.P.G.; ALMEIDA, F.A.C.; LEITE, J.C.A.; SILVA, F.L.H. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, 249–255, 2003.

CHOI, H., EO, H., PARK, K., JIN, M., PARK, E., KIM, S., PARK, J.E., KIM, S. A water-soluble extract from *Cucurbita moschata* shows anti-obesity effects by controlling lipid metabolism in a high fat diet-induced obesity mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 359; 419–425, 2007.

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.D.V.C. Interação dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do β -caroteno na bioconversão desses em vitamina A. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, 2001.

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.D.V.C. Alterações estruturais in vivo dos isômeros todo-trans, 9-cis e 13-cis do β -caroteno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n. 3, p. 224-228, 2002.

CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of comercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, p. 590–595, 1997.

DE CARVALHO, L.M.J.; GOMES, P.B.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, S.; MONTE, P.H.F.; DE CARVALHO, J.L.V.; NUTTI, M.R.; NEVES, A.C.L.; VIEIRA, A.C.R.A.; RAMOS, S.R.R. Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. **Food Research International**, v. 47, p. 337-340, 2012.

DE ESCALADA PLA, M.F.; PONCE, N. M.; STORTZ, C.A.; GERSCHENSON, L.N.; ROJAS, A.M. Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). **LWT – Food Science and Technology**, 40, 1176–1185, 2007.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DIETZ, J. M.; KANTHA, S.S.; ERDMAN JR, J. W. Reversed phase HPLC analysis of α - and β -carotene from selected raw and cooked vegetables. **Plant Foods and Human Nutrition**, v. 38, p. 333-341, 1988.

DOMINGUES, M.C.S.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Indução do amadurecimento de frutos cítricos em pós-colheita com a aplicação de ethephon. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 555-558, 2001.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLETZ, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 57, p. 1768-1774, 2009.

DUTTA, D.; CHAUDHURI, U.R.; CHAKRABORTY, R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.13, 1510-1520, 2005.

ELLIOTT, R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, 147-154, 2005.

EPLER, K.S.; ZEIGLER, R.G.; CRAFT, N.E. Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in foods. **Journal of Chromatography**, v. 619, 37-48, 1993.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database – FAOSTAT, 2003. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acessado em 5 de maio de 2012.

FLOEGEL, A.; KIM, D-O.; CHUNG, S-J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. Carotenoides: Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2, 13, 40-45, 2000.

FRANCO, G. Tabela de Composição de Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 9. ed, 2001.

GAZINO, J.M.; JOHNSON, E.J.; RUSSEL, R.M.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; RIDKER, P.M.; FREI, B.; HENNEKENS, C.H.; KRINSKY, N.I. Discrimination in absorption or transport of β -carotene isomers after oral supplementation with either *all-trans*- or *9-cis*- β -carotene. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 61, 1248-1252, 1995.

GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4976–4982, 2002.

GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of cis-isomers of provitamins A in Brazilian vegetables. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46, p. 3081-3086, 1998.

GOMES, M.R.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 11, n. 5, 2005.

GONZÁLEZ, E.; MONTENEGRO, M.A.; NAZARENO, M.A.; LÓPEZ DE MISHIMA, B.A. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). **Arch. Latinoameric. de Nutric.**, 51(4), 395–399, 2001.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.B.I.; ROJAS-HIDALGO, E. Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, p. 2135-2140, 1992.

HAN, J.; RHEE, K.S. Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. **Meat Science**, v. 70, 25–33, 2005.

HANDELMAN, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, p. 818 – 822, 2001.

HART, D.J.; SCOTT, K.J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, 54, p. 101-111, 1995.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 25-31, 1998.

HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C.; LISSI, E. Formation and Decay of the ABTS Derived Radical Cation: A Comparison of Different Preparation Procedures. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 34, n. 12, p. 659-665, 2002.

HIGDON, J. Micronutrient Information Center: carotenoids. Linus Pauling Institute, Oregon State University, 2005. Disponível em: <<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/carotenoids/index.html>>. Acesso em 5 de junho de 2013.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **TABELAS de Composição de Alimentos – ENDEF**. 5ª ed. Rio de Janeiro, 1999. 137p. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/Tabela%20de%20Composicao%20de%20Alimento-ENDEF.pdf>>.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Despesas, Rendimentos e Condições de Vida. IBGE: Rio de Janeiro, 2010. 222p.

Instituto Adolf Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Ed. IV. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008. 1020p.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z. M.; FOONG, C. W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chem.**, v. 87, n. 4, p. 581-586, 2004.

JACOBO-VALENZUELA, N.; MARÓSTICA-JUNIOR, M.R.; ZAZUETA-MORALES, J.J.; CALLEGOS-INFANTE, J.A. Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca. **Food Research International**, v. 44, p. 2587-2593, 2011.

JANAKIRAM, N.B.; COOMA, I.; MOHAMMED, A.; STEELE, V.E.; RAO, C.V. β -Ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor- α in human colon cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 181-190, 2008.

JARDINI, F.A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L) – participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação.**

Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005. 129p.

JIANG, Z.; DU, Q. Glucose-lowering activity of novel tetrasaccharide glyceroglycolipids from the fruits of *Cucurbita moschata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2011.

KALLUF, V.H. **Desidratação da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*) e seus teores de beta-caroteno**. Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2006. 59p.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, n. 36, 703-725, 2001.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 2, p. 153-161, 2002.

KIM, D.-O.; CHUN, O.K.; KIM, Y.J.; MOON, H.Y.; LEE, C.Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p. 6509–6515, 2003.

KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 231-326, 2003

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; GODOY, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. **Food Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 187-195, 1990.

KU, J.C.; VALLEJO, P.R.; GONZÁLEZ, F.C.; SERVIA, J.L.C. Diversidad morfológica de Calabaza cultivada en el centro-oriente de Yucatán, México. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 28, n. 4, p. 339-349, 2005.

KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. HPLC-DAD-MSⁿ characterization of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. **Food Chemistry**, v. 110, p. 522–530, 2008.

KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E; KIM, Y.C.; SHETTY, K. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 266–275, 2007.

LAGOURI, V.; BOSKOU, D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. **Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence**, p. 869-879, 1995.

LESSIN, W.J.; CATIGANI, G.L.; SCHWARTZ, S.J. Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3728-3732, 1997.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Cambi)**. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008. 219p.

LIRA, S.R.; MONTES, H.S. Cultivos marginados otra perspectiva de 1992. La agricultura en Mesoamérica. Cucurbita (*Cucurbita spp.*). Cultivos Andinos-FAO. FAO, n. 26, 1992.

LUCIA, C. M. D.; CAMPOS, F. M.; MATA, G. M. S. C.; SANT'ANA, H. M. P. Controle de perdas de carotenoides em hortaliças preparadas em unidades de alimentação e nutrição hospitalar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1627-1636, 2008.

LUENGO, R.F.A.; PARMAGNANI, R.M.; PARENTE, M.R.; LIMA, M.F.B.F. **Tabela de composição nutricional das hortaliças**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 4p. (Embrapa Hortaliças. Documentos, 26).

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ; L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594- 598, 1968.

MARTINS, E.C.; LEONARDI, R.R.; OLIVEIRA, C.R.; MATSUMOTO, F.M.T. Liofilização como alternativa para conservação do leite humano. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 29, n. 2, p. 119-122, 2011.

MARTINS, M.C.; OLIVEIRA, Y.P.; COITINHO, D.C.; SANTOS, L.M.P. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 5-18, 2007.

MAYNE, S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 7, p. 690- 701, 1996.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. **Capacidade antioxidante de frutas**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 2, 2008

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; ARROXELAS, G.L.; SANTANA, A.P.M. Capacidade antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico. **Revista da Sociedade Brasileira de Nutrição**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 85-95, 2009.

MERCADANTE, A. Z. Chromatographic separation of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, p. 52S-57S, 1999.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Effect of ripening, cultivar differences, and processing of the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 128-130, 1998.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 91, 1971.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**. v. 84, p. 407-412, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria SAS/MS Nº 437, 08 de outubro de 2001. Anexo II - Tratamento de Reposição e Manutenção de Estoques de Ferro em Pacientes Portadores de Insuficiência Renal Crônica: Sacarato de Hidróxido de Ferro III. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/PT-437.htm>>. Acesso em: 13 de setembro de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde da criança**: Nutrição Infantil, Aleitamento Materno e Alimentação Complementar. Caderno de Atenção Básica, nº 23. EDITORA MS, Brasília (DF), 2009. 112p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. ; **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 211, p. 213-219, 2004.

MONTEIRO, C. A. "A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil". São Paulo, Estudos Avançados, v. 9, n. 24, 1995, pp. 195-207.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS-NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; AMORIM, E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 338-344, 2006.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MURKOVIC, M.; MULLEDER, U.; NEUNTEUFL, H. Carotenoid content in different varieties of pumpkins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 633–638, 2002.

MURPHY, E.W.; CRINER, P.E.; GRAY, B.C. Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 23, p. 1153-1157, 1975.

NAGRA, S. A.; S. KHAN. Vitamin A (β -carotene) losses in Pakistani cooking. **J. Sci. Food Agric.**, v. 46, p. 249-251, 1988.

NEVES, A.C.L. Carotenoides em abóbora amarela (*Cucurbita moschata* duchesne) creoula crua e retenção real de α e β -caroteno após diferentes tipos de cozimento. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2011. 53p.

NutritionData. Nutrition Facts and Analysis for Squash, winter, butternut, raw. Disponível em: <<http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/2647/2>>. Acesso em 20 de dezembro de 2011.

ORNELLAS, L.H. Técnica Dietética, Seleção e Preparo de Alimentos, Editora Atheneu- São Paulo, 183, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E. Analysis of antioxidant activity of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PACHECO, S. Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaios de carotenoides por cromatografia líquida. Dissertação de Mestrado. Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009, 105p.

PAIVA, S.A.R.; RUSSEL, R.M. β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 5, 426–433, 1999.

PAIXÃO, J.A.; STAMFORD, T.L.M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos- uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 96-105, 2004.

PALACE, V.; HILL, M.H.; FARAHMAND, F.; SINGAL, P.K. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function following myocardial infarction. **Circulation**, v. 99, p. 121–126, 1999.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N.I. β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 297, n. 1, p. 184- 187, 1992.

PEDROSA, J. F. Caracterização agrônômica e qualitativa de plantas e frutos de introdução de *C. maxima* e *C. moschata*. Dissertação de Mestrado. Viçosa, MG: UFV, 1981. 164p.

PENTEADO, M.V.C. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, São Paulo: Manole, 2003. 612p.

PEREIRA, G.I.S.; PEREIRA, R.G.F.A.; BARCELOS, M.F.P.; MORAIS, A.R. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n. 4, p. 852-857, 2003.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PORT'S, P.S.; CHISTÉ, R.C.; GODOY, H.T.; PRADO, M.A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, 2013. < <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.010>>

RAMALHO, A.; PADILHA, P.; SAUNDERS, C. Análise crítica de estudos brasileiros sobre deficiência de vitamina A no grupo materno-infantil. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 26, n. 4, 2008.

RAMOS, S.R.R.; LIMA, N.R.S.; ANJOS, J.L.; CARVALHO, H.W.L.; OLIVEIRA, I.R.; SOBRAL, L.F.; CURADO, F.F. Documentos 154: Aspectos técnicos do cultivo da abóbora na região Nordeste do Brasil. 1ª ed. Embrapa, Aracajú, Sergipe, 2010.

RAMOS, S.R.R.; QUEIROZ, M.A.; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. Recursos genéticos de *Cucurbita moschata*: caracterização morfológica de populações locais coletadas no Nordeste brasileiro. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/index.html>>. Acesso em 06 de abril de 2012.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, 55: 207-216, 2007.

ROCK, C.L. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, 6, 3, p. 185-197, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI), Arlington, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, DC: OMNI Research, 2001, 71p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; AMAYA-FARFAN, J. Estado actual de los métodos analíticos para determinar pró-vitamina A. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 44, n. 1, p. 180-199, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Washington, DC e Cali: IFPRI e CIAT. HarvestPlus Technical Monograph, 2, 2004, 58p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes de carotenoides**: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 99p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T., AMAYA-FARFAN, J. Updated brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21, 445– 463, 2008.

ROURA, S.I.; DEL VALLE, C.E.; AGUERO, L.; DAVIDOVICH, L.A. Changes in apparent viscosity and vitamin C retention during thermal treatment of Butternut Squash (*Cucurbita moschata* Duch) pulp: Effect of ripening stage. **Journal of Food Quality**, 30, p. 538-551, 2007.

RUEL, M.T. Can Food- based Strategies Help reduce Vitamin A and Iron deficiencies? A review of recent Evidence. International Food Policy research Institute. Washington, 2001, 79p.

RUFINO, M.S.M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico Embrapa**, julho, 2007a.

RUFINO, M.S.M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Comunicado técnico Embrapa**, julho, 2007b.

SANT'ANA, S.H.M.; STRINGHETA, P.C.; BRANDÃO, S.C.C.; AZEREDO, R.M.C. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota L.*) prepared by food service. **Food Chemistry**, 61(1): 45-51, 1998.

SANTOS, A.C.; RAMOS, S.R.R.; GÓIS, G.R.; CARDOSO, B.T.; RIBEIRO, I.B.O.; CAMPOS, E.T. Avaliação preliminar para características químicas e nutricionais em frutos de variedades tradicionais de abóbora. IV Reunião de Biofortificação, Teresina, 2011.

SAWAI, Y.; MOON, J.H.; SAKATA, K.; WATANABE, N. Effects of Structure on Radical-Scavenging Abilities and Antioxidative Activities of Tea Polyphenols: NMR Analytical Approach Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radicals, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 3598-3604, 2005.

SCALFI, L.; FOGLIANO, V.; PENTANGELO, A.; GRAZIANI, G.; GIORDANO, I. RITIENI, A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of *Corbarini* small tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1363–1366, 2000.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, 112, 654–65, 2009.

SEMBA, R.D.; BLOEM, M.W. **Nutrition and HealthTM**: Nutrition and Health in Developing Countries. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2008. 914p.

SEO, J.S.; BURRI, B.J.; QUAN, Z.; NEIDLINGER, T.R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. **Journal of Chromatography A**, 1073, 371–375, 2005.

SHIBAO, J.; BASTOS, D.H.M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SILVA, A.V.C.; OLIVEIRA, D.S.N.; YAGUIU, P.; CARNELOSSI, M.A.G.; MUNIZ, E.N.; NARAIN, N. Temperatura e embalagem para abóbora minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 391-394, 2009.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, 95-103, 1999.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. 6. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010. 1104 p.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, 71-81, jan./abr., 2002.

SOUZA, W.A.; BOAS, O.M.G.C.V. A deficiência de vitamina A no Brasil: Um panorama. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington.12 (3): 173-179, 2002.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 41, 753-758, 2003.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; VON LAAR, J.; SIES, H. All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with 9-cis geometrical isomer. **Journal of Nutrition**, 125, 2128–2133, 1995.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 24, n. 6, 345-351, 2003.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science and Technology**, 43(3): 560-567, Março, 2008.

SWAIN, T.; HILLIS, W. T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.10, 135-144, 1959.

TACO: *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 4^a ed. Campinas: Ed. Nepa-Unicamp, 2011. 161p.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, p. 669–675, 2006.

TIVERON, A.P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. 103p.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y.S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, v. 93, p. 713–718, 2005.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

UNDERWOOD, B.A. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 517-524, 1994.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/BRASILFOODS (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-USP. Versão 5.0. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: 03.06.2013.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25, 2012. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3172?qlookup=moschata&fg=&format=&man=&lfacet=&max=25&new=1>>. Acesso em 05 de maio de 2013.

VAN POPPEL, G.; GOLDBOHRM, R.A. Epidemiologic evidence for β -carotene and cancer prevention. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1393S-1402S, 1995.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 39, p. 44-84, 2008.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VERONEZI, C.M.; JORGE, N. Carotenoides em abóbora. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)**, Curitiba, v. 29, n. 1, 2011.

VHANGANI, L.N.; WYK, J.V. Antioxidant activity of Maillard Reaction Products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. **Food Chemistry**, v. 137, p. 92-98, 2013.

VILLANO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, 501-509, 2004.

VINSON, J.A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3630-3634, 1998.

WANG, H.; CAO, G.H.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.

WANG, M.; LI, J. RANGARAJAN, M.; SHAO, Y.; LAVOIE, E.J.; HUANG, T-C.; HO, C-T. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4869-4873, 1998.

WANGCHAROEN, W.; MORASUK, W. Antioxidant capacity and phenolic content of some Thai culinary plants. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 02, p. 100-106, 2007.

WARDLAW, G.M.; INSEL, P.M.; SEYLER, M.F. **Contemporary Nutrition: Issues and Insights**, 2ª. ed., Mcgraw-Hill Book, 1994, 602p.

WHITAKER, T. W.; BEMIS, W.P. Origin and Evolution of the Cultivated Cucurbita. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Vol. 102, nº. 6, p. 362-368, 1975.

WOODALL, A.A.; BRITTON, G.; JACKSON, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 575–586, 1997.

WOOTTON-BEARD, P.C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, p. 217-224, 2011.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026-4037, 2004.

XIA, T.; WANG, Q. Antihyperglycemic effect of Cucurbita ficifolia fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 77, 530–533, 2006.

XIA, T.; WANG, Q. Hypoglycaemic role of Cucurbita ficifolia (Cucurbitaceae) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, 1753–1757, 2007.

ZIEGLER, R.G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 251S-259S, 1991.

ZHOU, K.; YU, L. Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado. **LWT**, v. 39, p. 1155-1162, 2006.