

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ALICE MARIA CARDOSO BARRETO

PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE *Cucurbita ficifolia*
BOUCHÉ PARA FITOTERÁPICOS

BRASÍLIA
2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ALICE MARIA CARDOSO BARRETO

**PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE *Cucurbita ficifolia*
BOUCHÉ PARA FITOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Celso Luiz Moretti

BRASÍLIA – DF
2015

BARRETO, Alice Maria Cardoso. Parâmetros de Controle de Qualidade de *Cucurbita ficifolia* Bouché para Fitoterápicos / Alice Maria Cardoso Barreto, Brasília, 2015, 40 p.

Orientador: Celso Luiz Moretti

1. Diabetes *Mellitus* 2. Fitoterapia 3. Controle de Qualidade 4. *Cucurbita ficifolia* Bouché

ALICE MARIA CARDOSO BARRETO

**PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE *Cucurbita ficifolia*
BOUCHÉ PARA FITOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em de novembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Luiz Moretti (UnB) (Presidente)

Prof. Dra. Lucimeire Pilon (Embrapa Hortaliças)

Dra. Lidiane Muniz Batista (Universidade Federal de Goiás)

Prof.^a Dra. Marina Kiyomi Ito (UnB)

*A Deus e à minha família, em
especial a meu marido Rafael, pelo
apoio, incentivo e amor incondicional*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo e me dar Forças, Saúde e Perseverança para mais esta conquista;

Ao meu marido Rafael por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando, pelo Amor Incondicional e paciência nos momentos difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais Francisco e Ângela que me ensinaram a não desistir e a lutar pelo que quero com todas as forças! Aos meus irmãos Pedro e Francisco pelo apoio e incentivo em toda essa jornada;

Às minhas primas Zaira, Zandra e Camila por serem a minha base onde posso apoiar sempre que preciso, onde sei que posso confiar que estarão sempre lá por mim!;

Ao prof. Dr. Celso pela orientação e oportunidade;

À profa. Yris, pela orientação, apoio, pelos momentos que me acalmava quando tudo estava complicado. Você é um exemplo de profissional, aprendi muito com você;

À Dra. Lucimeire, pela orientação, conselhos, auxílio, puxões de orelha e também pelos bons momentos de aprendizado! “Que pó minha gente!?!”

Aos técnicos do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial Ricardo e Deusânio pelo incentivo e apoio em algumas das etapas desse trabalho;

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade de Fitoterápicos, em especial a Michelle pela ajuda nas análises e pelas boas conversas;

À minha amiga Larissa que esteve comigo em todos os momentos, sem você eu não teria conseguido!

A todos do Hotel América e Hotel Grand Bittar pelo apoio, em especial o Ouaik e a Katiuss pela amizade, pelos momentos de risada e descontração na hora do almoço.

Ao Diego, pela amizade e paciência ao longo desta jornada.

Enfim, meu muito obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
	Lista de Tabelas	11
	Lista de Figuras	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Diabetes <i>Mellitus</i>	15
2.2	Abóbora-gila	16
2.3	Abóbora-gila e o D-chiro inositol	17
2.4	Medicina Tradicional e Alternativa	20
2.5	Controle de qualidade	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Material vegetal	22
4.2	Obtenção de <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché liofilizada	23
4.3	Determinação da distribuição granulométrica do fruto liofilizado	23
4.4	Determinação de umidade	24
4.5	Determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido	24
4.6	Controle de qualidade microbiológica	25
4.6.1	Contagem total de microrganismos mesófilos	25
4.6.2	Contagem total de Fungos	25
4.6.3	Contagem total de microrganismos patogênicos	26
4.6.3.1	<i>Escherichia coli</i>	26
4.6.3.2	<i>Salmonella</i>	26
4.6.3.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.7	Análise estatística	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Granulometria	27
5.2	Teores de umidades, cinzas totais e insolúveis em ácido	28
5.3	Análise Microbiológica	31
	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	36

RESUMO

Parâmetros de Controle de Qualidade de *Cucurbita Ficifolia* Bouché para Fitoterápicos

A *Cucurbita ficifolia* Bouché, conhecida no Brasil por abóbora-gila, vem sendo estudada por suas propriedades anti-hiperglicemiantes para uso como coadjuvante no tratamento do diabetes mellitus (DM). O objetivo deste estudo foi a caracterização física, química e microbiológica da casca, polpa e semente deste fruto e a determinação dos parâmetros de controle de qualidade para elaboração de fitoterápicos. As abóboras-gila foram colhidas aos 60, 70 e 80 dias após a antese (DAA). Os frutos foram sanitizados e a polpa, a casca e as sementes foram separadas e trituradas. Foram armazenados individualmente em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD) e congelados a -18 °C. O material foi liofilizado e moído para a realização das análises granulométricas, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, teor de umidade, contagem de microrganismos mesófilos e fungos, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. As amostras de casca e sementes foram classificadas como pó grosso, já que mais de 40% passaram pelo tamis de 75 µm (número 200). Os maiores teores médios de umidade foram encontrados na polpa (3,5%) da abóbora-gila, diferindo da casca (1,2%) e da semente (1,1%). As cinzas totais não diferiram durante as épocas de colheita para a casca (2,7%) e para as sementes (2,6%); a polpa do fruto apresentou o maior valor (3,7%) aos 60 DAA. As cinzas insolúveis em ácido não apresentaram diferença significativa durante as épocas de colheita para nenhuma das partes da abóbora-gila analisadas; os valores médios para a casca, polpa e sementes foram de 0,52, 0,55 e 1,02%, respectivamente. As contagens de microrganismos mesófilos não diferiram entre a polpa (1,7 log UFC g⁻¹) e a semente (1,2 log UFC g⁻¹), já a casca apresentou 2,7 log UFC g⁻¹. Todas as partes do fruto apresentaram semelhança quanto à contagem de fungos, 2,8 log UFC g⁻¹ para a casca, 2,2 log UFC g⁻¹ para a polpa e 2,4 log UFC g⁻¹ para a semente. Não foram detectados *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. Os parâmetros de controle de qualidade estabelecidos podem ser utilizados como referência em futuros estudos relacionados à elaboração de fitoterápicos a partir de abóbora-gila como matéria-prima.

Palavras-chave: Granulometria, Umidade, Cinzas, Microbiológico, Fungos.

ABSTRACT

Quality Control Parameters of *Cucurbita Ficifolia* Bouché for Phytotherapeutics

Cucurbita ficifolia Bouché has been studied for its anti-hyperglycemic properties for use as an adjunct in the treatment of diabetes mellitus (DM). This study aimed at the physical, chemical and microbiological characterization of skin, flesh and seeds of this fruit, as well as the determination of the quality control parameters for phytotherapy use. The fruits were harvested at 60, 70 and 80 days after anthesis (DAA). They were sanitized and skin, flesh and seeds were separated and crushed. Afterwards, they were packed individually in low density polyethylene bags (LDPE) and frozen at -18 °C. The material was lyophilized and ground to carry out the grain size analysis, total ash, acid insoluble ash, moisture content, mesophilic and fungi count, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. Samples of skin and seeds were classified as thick, since more than 40% were retained on sieves of 75 μm (#200). The highest moisture content was found for the flesh (3.5%), differing from the skin (1.2%) and seed (1.1%). The total ash of skin (2.7%) and seed (2.6%) did not differ during the harvest time, and the fruit flesh had the highest value (3.7%) at 60 DAA. Acid insoluble ash showed no significant difference during harvest times for the fruit parts; mean values for skin, flesh and seed were 0.52, 0.55 and 1.02%, respectively. Mesophilic counts did not differ between flesh (1.7 log CFU g^{-1}) and the seed (1.2 log CFU g^{-1}); the skin showed 2.7 log CFU g^{-1} . All parts of the fruit showed similarity in fungi count, 2.8 log CFU g^{-1} for skin, 2.2 log CFU g^{-1} for flesh and 2.4 log CFU g^{-1} for seed. No *Escherichia coli*, *Salmonella* e *S. aureus* were detected. The established quality control parameters can be used as reference for future studies related to preparation of herbal medicines from *Cucurbita ficifolia* Bouché as raw material.

Keywords: Granulometry, Moisture, Ash, Microbiological, Fungi.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 Microrganismos mesófilos ($\log \text{ UFC g}^{-1}$) em casca, polpa e sementes de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA 32
- Figura 2 Fungos ($\log \text{ UFC g}^{-1}$) em casca, polpa e sementes de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Granulometria (% retida) da casca, polpa e sementes de <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA	28
Tabela 2	Teores de umidade (%), cinzas totais (%) e cinzas insolúveis em ácido (%) em ácido em casca, polpa e sementes de <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA	30

1 INTRODUÇÃO

A *Cucurbita ficifolia* Bouché é conhecida no Brasil como abóbora-gila, gila ou chila (Heiden et al., 2007; Priori et al., 2010) e no México como “Chilacayote” (Andrade-Cetto 2005; Alarcon-Aguilar, 2002). É uma planta medicinal comumente usada para tratamento de diabetes tipo 2, na Ásia, África e México (Alarcon-Aguilar et al., 2002; Xia e Wang, 2006a; Xia e Wang, 2009).

Diversos estudos apontam que o extrato dessa abóbora possui efeito anti-hiperglicemiante em modelos animais (Alarcon-aguilar et al., 2002; Xia e Wang, 2006a), hipoglicemiante em humanos e ratos (Acosta-Patiño et al., 2001; Xia e Wang 2006b; Xia e Wang 2007), antioxidante (Xia e Wang, 2007; Diaz-Flores et al., 2012; Ramon-Ramos et al., 2012 e Fortis-Barrera et al., 2013), anti-inflamatório (Ramon-Ramos et al., 2012 e Fortis-Barrera et al., 2013) e ação benéfica nas dislipidemias (Xia et al. 2009 e Ramon-Ramos et al., 2012). Estas propriedades decorrem do fato dessa ser fonte de D-chiro-inositol, que atua como mensageiro secundário na transdução do sinal da insulina (Xia e Wang, 2006b e Fortis-Barrera et. al., 2013).

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica que afeta o metabolismo de macronutrientes. É caracterizada por altos níveis de glicose no sangue devido à diminuição na secreção de insulina ou resistência a sua ação. A prevalência dessa doença alcançou proporções epidêmicas afetando 9% dos adultos em todo o mundo e estima-se ser responsável por 1,5 milhões de óbitos anuais (WHO, 2014). O DM tipo 2 (DM 2) é decorrente da diminuição da captação de glicose periférica com consequente aumento no nível de glicose no sangue (Bayat et al., 2014, ADA, 2014).

As terapias para o tratamento do diabetes incluem a insulina e vários agentes antidiabéticos (Patel et al., 2012; SBD, 2015). Muitos deles provocam vários efeitos adversos graves e, portanto, torna-se relevante a busca de alternativas que minimizem essas complicações. O uso de plantas com efeitos anti-hiperglicemiantes como coadjuvantes ao tratamento medicamentoso do diabetes tipo 2 pode ser uma terapêutica eficaz. Cerca de 70% de adultos com diabetes nos Estados Unidos utilizam plantas medicinais como alternativa

disponível para o tratamento dessa doença (El-Abhar et al., 2014 e Miranda-Pérez et al., 2013).

Embora a abóbora-gila apresente o D-chiro-inositol, composto bioativo relacionado ao controle do diabetes, existe uma lacuna em questões concernentes ao controle de qualidade dessa planta para uso medicinal. Na literatura consultada, verificou-se carência de investigação sobre a segurança dessa matéria-prima para elaboração de um fitoterápico, informações fundamentais para atender as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, órgão de controle sanitário de produtos e serviços do país, e assegurar a comercialização do produto.

Com isso, este estudo visou à caracterização física, físico-química e microbiológica da matéria-prima (abóbora-gila) liofilizada e com base na legislação vigente, propor parâmetros de controle de qualidade para elaboração de fitoterápico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é definido como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos de etiologia múltipla, resultante de defeitos na secreção e ou ação da insulina (SBD, 2015; Xia e Wang, 2007). Aproximadamente 95% dos casos de diabetes *mellitus* são do tipo 2 (DM 2), situação encontrada geralmente em indivíduos com sobrepeso e obesidade (Patel et al., 2012; SBD, 2015; Maiese, 2015).

Globalmente, cerca de 150 milhões de pessoas são diabéticas e espera-se dobrar a taxa de incidência até 2025 (El-Abhar et al., 2014). No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional em Saúde (PNS), 9,1 milhões de pessoas com 18 anos ou mais (6,2% da população) referiram diagnóstico médico de diabetes. Os maiores índices estão nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, com 7,1 e 6,5% de suas populações, respectivamente (IBGE, 2014).

Uma das formas de prevenir, tratar e gerenciar o DM é a terapia nutricional. Os indivíduos em risco de desenvolver DM tipo 2 devem ser estimulados às mudanças de estilo de vida, visando a perda moderada de peso corporal e prática semanal de atividade física. As estratégias nutricionais devem incluir redução energética e de gorduras, ingestão de fibras e limitação da ingestão de bebidas açucaradas (SBD, 2015).

As terapias medicamentosas disponíveis atualmente para o tratamento diabetes incluem a insulina e vários agentes antidiabéticos orais como as sulfonilureias, glinidas, inibidores das alfa-glicosidases, biguanidas, glitazonas e incretinas (SBD, 2015).

Os antidiabéticos orais tem a função de manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade (jejum $<100 \text{ mg dL}^{-1}$ e pós-prandial $<140 \text{ mg dL}^{-1}$), podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, os que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureias e glinidas); os que reduzem a velocidade de absorção de carboidratos (inibidores das alfa-glicosidases); os que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas) e os que aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas) (SBD, 2015 e El-Abhar et al., 2014). Já as incretinas são capazes de provocar

hiperinsulinemia apenas em situações de hiperglicemia, mediado pelos hormônios GLP-1 (glucagon-like peptide-1) e GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) (SBD, 2015).

Estes agentes causam efeitos secundários indesejáveis. O uso das biguanidas, por exemplo, resultam em toxicidade renal, as incretinas causam problemas gastrointestinais graves como azia, náuseas, vômitos, indigestão e diarreia e as injeções diárias de insulina podem não coincidir com o momento da ocorrência natural e dosagem da secreção de insulina pelo pâncreas em resposta à hiperglicemia, resultando em complicações graves (SBD, 2015). Devido a esses efeitos adversos, a procura por agentes mais eficazes é uma importante área de investigação (Patel et al., 2012; Xia e Wang, 2006b).

Logo, os pesquisadores têm concentrado esforços para estudos de medidas terapêuticas alternativas que causem menos efeitos colaterais e que possam atuar como coadjuvantes no tratamento do diabetes melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

2.2 Abóbora-gila

A *Cucurbita ficifolia* Bouché, pertence à família das Cucurbitáceas, é uma planta rasteira, de característica perene, possui caule duro e superficialmente anguloso, folhas sem manchas com recorte intermediário, as flores são pentâmeras e axilares, as sementes são ovado-elípticas, achatadas e de cor variando do marrom escuro ao preto e a polpa branca com a textura fibrosa (Heiden et al., 2007; Andrade-Cetto 2005).

No Brasil, esta espécie de abóbora é cultivada na região sul e conhecida popularmente como abóbora-gila, gila ou chila (Heiden et al., 2007; Priori et al., 2010). É conhecida no México como “Chilacayote” (Andrade-Cetto 2005; Alarcon-Aguilar, 2002) cidra chayote ou pequena abóbora branca (Priori, et al., 2010; Acosta-Patiño et al., 2001). O fruto pode ser utilizado de diversas formas, quando imaturo é utilizado em saladas e no preparo de pratos salgados (Heiden et al., 2007, Alarcon-Aguilar, 2002) e o fruto maduro é utilizado para preparar doces cristalizados e sobremesas (Priori et al., 2010).

C. ficifolia possui 94% de umidade, 0,3% de fibras, 1,2% de proteínas, 17 mg de cálcio, 0,6 mg de ferro, 7 mg de ácido ascórbico, 0,03 mg de tiamina; e em 100 g produz 3,34 kJoule (14 Kcal) (Xia e Wang, 2009).

Na Ásia, África e América do Sul é comumente usada para tratamento de diabetes tipo 2 (Alarcon-Aguilar et al., 2002; Xia e Wang, 2006a; Xia e Wang, 2009). Estudos mostraram que *C. ficifolia* contém D-chiro inositol, substância que está relacionada ao efeito anti-hiperglicemiante desta planta (Xia e Wang, 2007; Xia e Wang, 2009; Fortis-Barreira, 2013).

2.3 Abóbora-gila e o D-chiro inositol

As moléculas de inositol, particularmente D-chiro inositol (D-CI), são importantes mediadores para a ação da insulina, atuando como mensageiro celular. Estão normalmente presentes na urina e sangue de mamíferos, mas estão ausentes ou em níveis reduzidos em modelos animais e em pacientes com diabetes de tipo 2. Isto sugere a produção insuficiente de D-CI e mostra uma correlação entre a diminuição da excreção urinária de D-CI e o grau de resistência à insulina (Xia e Wang, 2006b; Fortis-Barreira et al., 2013; El-Abhar., 2014).

Acosta-Patiño et al., (2001) investigaram o efeito de extrato de *C. ficifolia* nos níveis de glicose de homens e mulheres (n=10) diabéticos tipo 2 com hiperglicemia moderada (150 a 300 mg dL⁻¹) administrando 4 mL do extrato por quilo de peso corporal e medindo a glicemia de hora em hora durante 5h, o mesmo grupo de pacientes recebeu após 8 dias, a mesma quantidade de água potável (que não altera os níveis glicêmicos), também foi medida a glicemia de hora em hora por um período de 5 h. Os resultados mostraram ação hipoglicêmica após 3 a 5 h da ingestão do extrato. Este resultado demonstra o efeito hipoglicemiante agudo da abóbora, que não pode ser explicado pelo seu teor de fibras de apenas 0,3%, sugerindo, assim, ação do D-CI.

Alarcon-Aguilar et al. (2002) administraram via oral e intraperitoneal, suco de *C. ficifolia* Bouché liofilizada (500 mg kg⁻¹) por 14 dias em animais diabéticos induzidos por aloxana para investigar o seu efeito hipoglicêmico agudo, a sua toxicidade aguda (DL50) e o efeito hipoglicêmico produzido pela administração oral diária. Encontraram efeito hipoglicemiante agudo, tanto em ratos saudáveis

quanto nos diabéticos, reduzindo a glicemia de $78 \pm 4,8 \text{ mg dL}^{-1}$ para $54,8 \pm 2,7 \text{ mg dL}^{-1}$ em 120 minutos. A sua administração oral diária também normaliza a glicemia de ratos diabéticos após 14 dias de tratamento. A toxicidade aguda foi encontrada quando injetado intra-peritonealmente em doses únicas de 750 a 1.250 mg kg^{-1} e oralmente após 14 dias.

Hernandez-Galicia et al. (2002) também pesquisaram a toxicidade do suco de abóbora madura liofilizada (500 mg kg^{-1}) em ratos diabéticos induzidos por aloxano ($n=30$). Quando a administração foi realizada via intraperitoneal, a DL50 foi de 625 mg kg^{-1} , e para administração oral, a DL50 foi de 3.689 mg kg^{-1} , conferindo segurança no consumo dessa hortaliça para indivíduos com DM2.

Em modelos de cultura de células, níveis elevados de glicose resultam em estresse oxidativo, que elevam os níveis de glutathione peroxidase e aumentam a peroxidação lipídica, situações que afetam significativamente a vida celular (Maiese, 2015). Foi verificada redução significativa na glicemia e hemoglobina glicosilada e aumento da insulina plasmática e da hemoglobina total em animais diabéticos ($n=30$), induzidos por estreptozotocina, que receberam doses de 300 e $600 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de extrato metanólico de *C. ficifolia*, durante 30 dias sendo a dose de 600 mg kg^{-1} mais efetiva (Xia e Wang, 2006a). O aumento no peso corporal e do glicogênio hepático também foi observado, constatando-se que esse extrato pode ser uma fonte eficaz de D-CI com efeitos hipoglicêmicos em ratos (Xia e Wang, 2006b).

Em estudo do mecanismo de ação do extrato metanólico de *C. ficifolia* em células β pancreáticas de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina ($n=24$), que receberam dose de $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ por 30 dias, foi verificada a redução na glicemia plasmática e na peroxidação lipídica dessas células, bem como o aumento da insulina plasmática, indicando ação hipoglicêmica e antioxidante, respectivamente (Xia e Wang, 2007). Em relação aos parâmetros lipídicos, os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) foram aumentados e os triglicerídeos e os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram reduzidos (Xia e Wang, 2009).

Diaz-Flores et al. (2012), quando avaliaram a ação da dose de 200 mg kg^{-1} de extrato aquoso de *C. ficifolia* em ratos machos diabéticos ($n=40$), induzidos por estreptozocina, durante quatro semanas, observaram aumento da atividade da enzima glutathione peroxidase e glutathione reductase no fígado,

pâncreas e rim, além da redução significativa da glicemia, de hemoglobina glicada, da polidipsia, da hiperfagia e da peroxidação lipídica no plasma.

Ramon-Ramos et al. (2012) investigaram o efeito antioxidante e anti-inflamatório do fruto maduro de *C. ficifolia* (200 mg kg⁻¹ dia⁻¹) durante 30 dias em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (n=6) e encontraram que a glicemia, triglicerídeos e os níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) reduziram significativamente, não houve alterações no colesterol total e transaminases hepáticas e aumentaram os níveis de interleucina-6 (IL-6) e interferon γ (IFN- γ) que estão envolvidas no desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade, DM 2 e suas complicações.

Miranda-Perez et al. (2012) trataram células RINmF5 (linhagem de células derivadas de tumor nas ilhotas de Langerhans produtoras de insulina) com extrato aquoso de *C. ficifolia* contendo 3,3 mg de D-CI/ g e 0,25 μ M de D-CI padrão (concentração que causou melhor viabilidade celular) e encontrou que ambos os tratamentos aumentaram significativamente a expressão de insulina. O efeito hipoglicêmico pode ser explicado pelo aumento do gene que codifica insulina. Nessa linhagem de células ambos os tratamentos aumentaram a expressão de Kir6.2, uma sub-unidade formadora dos canais de potássio (K⁺ATP) envolvidos na secreção de insulina em resposta à glicemia.

Bandera-Dorantes et al. (2012) investigaram o efeito da incubação com extrato aquoso de *C. ficifolia*, em concentrações crescentes de 1, 3, 10 e 30 μ g mL⁻¹, na contratilidade das válvulas cardíacas de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, que foram alimentados previamente por 30 dias com 250 mg kg⁻¹ dia⁻¹ de *C. ficifolia*. A administração da abóbora-gila por via oral reduziu os níveis de glicose (372,2 \pm 12,1 para 148,3 \pm 25,2) e de triglicerídeos (271,2 \pm 5,7 para 97,8 \pm 17,9), resultados similares aos relatados nos demais estudos. Porém, ao explicar o efeito hipoglicêmico do D-CI, os autores não observaram influência do extrato aquoso de *C. ficifolia* sobre os canais de K⁺ATP, propondo que a ação é devido a mecanismos independentes de proteína quinase, com nenhum efeito sobre o músculo liso, o que difere dos resultados da pesquisa de Miranda-Perez et al. (2012).

Fortis-Barreira et al. (2013) trataram células adiposas 3T3-L1 com extrato aquoso de *C. ficifolia* e D-CI sintético por 24 e 48 h e concluíram que os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do extrato de *C. ficifolia* pode ser

explicado em parte pelo teor D-CI, que modula a razão de enzimas antioxidantes e contribui para um estado pró-inflamatório reduzido. Tratamentos com *C. ficifolia* e D-CI podem reduzir os distúrbios causados pelo estresse oxidativo. Além disso, o D-CI pode melhorar a sensibilidade à insulina através de seus efeitos insulino-mimético.

2.4 Medicina Tradicional e Alternativa

A Medicina Tradicional é definida pela Organização Mundial de Saúde – OMS como a soma total do conhecimento, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas em diferentes culturas, sendo explicáveis ou não, usadas na manutenção, prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento da saúde. Em alguns países, a Medicina Tradicional ou Medicina Não Convencional pode ser denominada Medicina Complementar (WHO, 2013).

De acordo com a OMS, cerca de 90% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas e seus produtos para cuidados primários em saúde (WHO, 2002). Nos últimos anos, o interesse da população pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e o uso de plantas medicinais e fitoterápicas encontra-se em expansão (Kaur et al., 2013).

No Brasil, a ANVISA, na RDC nº 48/2004 (BRASIL, 2004), define fitoterápico como medicamento obtido através do emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Pode ser caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Já foram mencionadas mais de 200 espécies de plantas que possuem propriedades antidiabéticas, estas foram avaliadas principalmente por rastreamento da literatura sobre o tema sem o necessário aprofundamento do modo exato de ação de seus princípios ativos (El-Abhar, 2014).

Nahin et al. (2012), analisaram os dados do Inquérito Nacional de Saúde (*National Health Interview Survey - NHIS*) de 2002 e 2007, e observaram o uso de Medicina Alternativa em 30,9% (n= 4,51 milhões) dos pacientes diabéticos tipo 2, sendo que apenas 3,43% (n= 154 mil) destes usavam para o tratar ou

gerenciar a doença. Destes, 20,13% (n= 28,38 mil) fizeram uso da medicina tradicional porque os tratamentos médicos convencionais não funcionaram, enquanto que 21,3% (n= 30 mil) não usaram porque eram muito caros.

2.5 Controle de qualidade

No Brasil, a fitoterapia é uma opção medicamentosa que está presente em vários municípios principalmente no atendimento primário à saúde e é incentivada pelo Ministério da Saúde e Anvisa através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Esta expansão da Medicina Alternativa, principalmente da fitoterapia, é devida aos efeitos adversos de fármacos sintéticos, à preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos e relativo baixo custo (WHO, 2013).

Recentemente, o país aprovou documentos importantes que direcionam aspectos de toda cadeia produtiva dos fitoterápicos e seu uso como terapêutica oficial, dentre os quais se destacam a RDC nº 14/2014 (BRASIL, 2014), que regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Esta resolução estabelece que a droga vegetal seja descrita em farmacopeias reconhecidas pela ANVISA, ou, em sua ausência, publicação técnico-científica. A farmacopeia é um documento que estabelece parâmetros para controle de qualidade das plantas medicinais e/ou seus derivados, bem como os requisitos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde e medicamentos, apoiando as ações de regulação.

Na RDC nº 26/2014 (BRASIL, 2014), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos determina que no relatório de produção e controle de qualidade os testes de pureza e integridade, incluindo cinzas totais e/ou cinzas insolúveis em ácido clorídrico; umidade e/ou perda por dessecação; pesquisa de matérias estranhas; pesquisa de contaminantes microbiológicos e pesquisa de metais pesados devem estar descritos. O controle de qualidade deve estar presente

desde o cultivo da droga vegetal até o produto final, mas também o estudo fotoquímico das plantas, farmacológico e toxicológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Propor parâmetros de controle de qualidade da *Cucurbita ficifolia* Bouché, segundo normas da Anvisa e da Farmacopeia brasileira, para o seu uso em fitoterápicos.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Determinar as propriedades químicas, físicas e microbiológicas da casca, polpa e sementes da abóbora liofilizadas;
- ii. Definir alguns dos principais critérios/parâmetros de controle de qualidade da espécie vegetal de *Cucurbita ficifolia* Bouché, segundo normas da Anvisa e da Farmacopeia brasileira, segundo RDC 26/2014.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As abóboras *Cucurbita ficifolia* Bouché foram cultivadas no campo de produção experimental da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF. Os frutos foram cultivados de janeiro a abril de 2011 e colhidos com 100, 110 e 120 dias (ponto ótimo de maturidade hortícola) de cultivo, o que correspondia a 60, 70 e 80 dias de maturação após antese (DAA), respectivamente, período entre a abertura da flor e o início da senescência dos estames e pistilo (Witter et al., 2005). Após a colheita, foram transportados para o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Embrapa Hortaliças, para a realização das análises.

Os frutos foram selecionados, classificados, lavados com água corrente e sabão neutro e sanitizados com solução de dicloroisocianurato de sódio

dihidratado 200 mg L⁻¹ (Sumaveg®, Johnson Diversey Brasil Ltda., São Paulo, SP), por 10 min. A polpa, a casca e as sementes foram separadas em recipientes individuais e trituradas em liquidificador industrial (Metvisa LQ-4, Santa Catarina, Brasil). Após o processamento, foram armazenados em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD), com aproximadamente 80 g de produto e congelados a -18 °C até o momento das análises.

4.2 Obtenção de *Cucurbita ficifolia* Bouché liofilizada

Os materiais vegetais previamente congelados foram liofilizados (Liotop®, São Carlos, SP) a uma pressão de 82 mmHg e temperatura média de 33 °C por 24 h, 36 h e 46 h, para casca, sementes e polpa, respectivamente. Após a liofilização, as amostras foram reduzidas a pó em moinho tipo Wiley, pesadas, transferidas para embalagens de polietileno, identificadas e submetidas a vácuo. Foram então armazenadas em caixa de isopor contendo sílica gel para evitar o ganho de umidade e posteriormente analisadas.

4.3 Determinação da distribuição granulométrica do fruto liofilizado

Para a padronização da granulometria da matéria-prima vegetal liofilizada, 25 g de amostras foram submetidas à passagem forçada por vibração através de tamises com aberturas de malha de 1,00; 0,106 e 0,59 mm e 150, 75 e 45 µm, usando-se um agitador de peneiras, (Produtest® T) durante 20 min.

O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó, de acordo com a fórmula: % retida no tamis = $(P1/P2)*100$, onde P1 é a massa da amostra retida em cada tamis; P2 é a soma das massas retidas em cada tamis e no coletor; e 100 é o fator de porcentagem. Esse procedimento foi repetido três vezes com três amostras de estágios de maturação diferentes (80, 70 e 60 dias após a antese) (ANVISA, 2010).

4.4 Determinação de umidade

Foram pesados 5 g de cada parte da matéria vegetal e colocados na balança termogravimétrica (Gehaka®IV 2000, São Paulo, SP). O resultado foi expresso em porcentagem.

4.5 Determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido

Para a determinação dos teores de cinzas totais e insolúveis em ácido, os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla (JUNG 2510, Blumenal, SC) a 450 °C durante 30 min, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica (BEL UMARK 250A, Piracicaba, SP) para obtenção da tara dos mesmos.

Para as análises de cinzas totais, foram pesados 2 g de cada material vegetal liofilizado e transferidos para os cadinhos previamente calcinados. Os cadinhos contendo as amostras foram então incinerados e, posteriormente, calcinados em mufla aquecida a 450 °C durante 2 h. Em seguida, foram arrefecidos em dessecador e suas massas foram determinadas. Esta operação foi repetida até a obtenção de valores de massa constantes. A porcentagem das cinzas totais foi calculada em relação à massa da droga vegetal. A análise foi realizada em triplicata (ANVISA, 2010).

Para as análises de cinzas insolúveis em ácido, foram utilizados o resíduo obtido das cinzas totais e adicionado 25 mL de ácido clorídrico 7%. Foram fervidos em cadinho coberto com vidro de relógio em bico de Bunsen, após esse processo, foi lavado o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. As cinzas foram recolhidas e filtradas em papel de filtro isento de cinzas. Foram transferidos para o cadinho este resíduo contido no papel filtro e incinerados em mufla a 450 °C por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior que 0,5 mg.

A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada usando-se a fórmula (%) = $P1 - P2 / P3 \times 100$, onde P1 é o peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (cadinho tarado); P2 é o peso do cadinho com

amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador; P3 é o peso da amostra inicial; e 100 é o fator de porcentagem (ANVISA, 2010).

4.6 Controle de qualidade microbiológica

4.6.1 Contagem total de microrganismos mesófilos

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, foram transferidos 5 g de cada tecido vegetal (casca, polpa e sementes) liofilizados para 90 mL de diluente universal, descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2010). Foi realizada a diluição seriada retirando-se 1 mL desta solução e adicionando em tubo de ensaio com 9 mL de diluente universal constituindo a diluição 10^{-2} após homogeneização. Pipetando-se 1 mL deste tubo para 9 mL de um segundo tubo de ensaio obteve-se a diluição 10^{-3} e a partir desta, a diluição 10^{-4} .

Foram plaqueados em profundidade, 1 mL de cada diluição (10^{-2} a 10^{-4}) em triplicata, em placas de Petri contendo 20 mL de ágar caseína-soja (HIMEDIA, Curitiba, PR). Após o plaqueamento, as placas permaneceram em repouso até completa solidificação do meio, sendo então incubadas invertidas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Após este período, foi realizada a contagem das colônias. Multiplicou-se a média aritmética da triplicata pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g^{-1} .

4.6.2 Contagem total de fungos

Para a contagem total de fungos, foi utilizado o mesmo procedimento do item 4.6.1. Após diluição seriada, foram plaqueados em profundidade, 1 mL de cada diluição (10^{-2} a 10^{-4}) em triplicata, em placas de Petri contendo 20 mL de ágar sabouraud-dextrose (HIMEDIA, Curitiba, PR) para verificar presença de fungos. Após o plaqueamento, as placas permaneceram em repouso até completa solidificação do meio, sendo então incubadas invertidas a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após este período, foi realizada a contagem das colônias. Multiplicou-se a média aritmética da triplicata pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g^{-1} .

4.6.3 Contagem total de microrganismos patogênicos

4.6.3.1 *Escherichia coli*

Para a contagem de *E. coli* foram utilizados 5 g de cada tecido vegetal (casca, polpa e sementes) liofilizados adicionados em 3 erlenmeyers contendo 90 mL de caldo de enriquecimento caseína-soja, que foram incubados a 32 °C por 24 h. Após incubação, foram transferidos 1 mL de cada solução para outros 3 erlenmeyers contendo 100 mL do caldo MacConkey (MERCK, Porto Alegre, RS) e novamente incubados a 43 °C por 24 h.

Decorrido este tempo, foram inoculados 1 mL destas últimas soluções em placas de Petri (cada tecido vegetal foi inoculado em triplicata) contendo 20 mL de ágar MacConkey (MERCK, Porto Alegre, RS) e, após completa solidificação do meio, foram incubadas a 32,5 °C por 24 h. Para a contagem, foi observada a presença ou ausência de colônias vermelhas. Multiplicou-se a média aritmética da triplicata pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹.

4.6.3.2 *Salmonella*

Para a análise de *Salmonella*, foi repetido o processo de incubação prévia em caldo caseína-soja a 32 °C por 24 h dos três tecidos vegetais (casca, polpa e sementes). Em seguida, foram transferidos 1 mL de cada erlenmeyer para 100 mL de caldo de enriquecimento *Salmonella* Rappaport Vassiliadis (MERCK, Porto Alegre, RS) e feita nova incubação a 32,5 °C por 24 h .

Após a segunda incubação, foi realizada a inoculação em profundidade de 1 mL de cada erlenmeyer nas placas de Petri contendo ágar xilose lisina desoxicolato (MERCK, Porto Alegre, RS) e incubação a 32,5 °C por 24 h, após completa solidificação do meio. O crescimento de colônias vermelhas com ou sem centro negro indicou resultado positivo. Multiplicou-se a média aritmética da triplicata pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹.

4.6.3.3 *Staphylococcus aureus*

Para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, foram realizados os mesmos procedimentos de incubação prévia a 32 °C por 24 h dos três erlenmeyers contendo 5 g de cada um dos tecidos vegetais da abóbora liofilizada e 90 mL de caldo de enriquecimento caseína-soja.

Foram transferidos 1 mL destas soluções para placas de Petri contendo 20 mL de ágar sal manitol (MERCK, Porto Alegre, RS), homogeneizados e após completa solidificação do meio, incubados a 32 °C por 24 h. Como resultado positivo foi considerado o aparecimento de colônias amarelas ou brancas rodeadas por uma zona amarela. Multiplicou-se a média aritmética da triplicata pelo respectivo valor de diluição. Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹.

4.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 3 (três tempos de colheita dos frutos: 60, 70 e 80 DAA x três partes analisadas: casca, polpa e sementes) com três repetições. Os resultados foram analisados usando-se o Modelo Linear Generalizado (GLM) do SAS® 9.2 e análise fatorial completa na Análise de Variância (ANOVA), seguida de comparação de médias pelo teste LSD (*Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Granulometria

A análise granulométrica permite conhecer o tamanho das partículas após a liofilização e possui influência direta sobre o processo extrativo dos compostos bioativos (Costa, 2002).

Quanto à distribuição granulométrica do pó do fruto de *Cucurbita ficifolia* Bouché, podemos observar que as sementes e a casca da abóbora-gila apresentaram comportamento semelhante (Tabela 1). Estes tecidos liofilizados apresentaram maior granulometria, sendo classificados como pó grosso,

segundo a Farmacopeia (ANVISA, 2010), já que mais de 40% destes tecidos liofilizados ficaram retidos no tamis de número 200 (75 μm) (Tabela 1). A polpa apresentou a menor granulometria, com a maior porcentagem retida na peneira de número 30 (0,59 μm) sendo classificada como pó fino.

Tabela 1. Granulometria (% retida) da casca, polpa e semente de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA.

DAA	Semente (% retida)					
	200* (75 μm)	140 (0,106 μm)	100 (150 μm)	30 (0,59 μm)	18 (1,0 μm)	Fundo
60	96,62 a	3,37 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
70	98,66 a	1,33 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
80	99,15 a	0,84 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c	0,00 c
DAA	Casca (%retida)					
	200* (75 μm)	140 (0,106 μm)	100 (150 μm)	30 (0,59 μm)	18 (1,0 μm)	Fundo
60	87,63 a	10,73 b	0,02 d	1,08 c	0,00 c	0,11 c
70	73,59 a	25,56 b	0,00 c	0,84 d	0,00 c	0,00 c
80	82,48 a	1,52 b	1,52 b	0,00 c	0,00 c	0,00 c
DAA	Polpa (%retida)					
	200* (75 μm)	140 (0,106 μm)	100 (150 μm)	30 (0,59 μm)	18 (1,0 μm)	Fundo
60	2,29 c	3,99 c	20,49 b	52,28 a	16,44 b	4,48 c
70	1,91 c	2,79 c	16,01 b	57,75 a	18,35 b	3,17 c
80	1,83 c	2,87 c	16,62 b	61,26 a	14,28 b	3,11 c

* Número do tamis (ABNT/ASTM)

Os dados representam as médias (\pm Desvio Padrão) de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste LSD a 5%.

5.2 Teores de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

O teor de umidade encontrada na droga vegetal liofilizada fornece informações sobre a eficiência do processo de liofilização e das condições de armazenamento da mesma. Ele está relacionado ao armazenamento correto do material e a falha nesta etapa pode ocasionar contaminação microbiana e degradação dos componentes químicos da amostra (Hubinger et al., 2008).

Os maiores teores de umidade foram encontrados na polpa da abóbora-gila, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos teores encontrados na casca e nas sementes (Tabela 2). A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO relata que a umidade em cucurbitáceas varia de 86 a 96% (TACO, 2011) o que explica a mais alta umidade encontrada na polpa liofilizada de *C. ficifolia* Bouché, nesta pesquisa.

Osuagwu e Edeoga (2014), estudando a composição centesimal das folhas, sementes e cascas das cucurbitáceas, encontraram que as sementes da *Cucurbita ficifolia* apresentou teor de umidade de 0,09% e a casca de 1,0%. Os valores encontrados para a casca foram semelhantes aos encontrados para *C. ficifolia* Bouché nesta pesquisa.

As cinzas totais é o nome dado ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, entre 550 a 570 °C, a qual é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, e tem como objetivo avaliar a quantidade de minerais na amostra. A cinza insolúvel em ácido avalia a presença de sílica, tratada com ácido clorídrico. É importante para a verificação da adição de matéria mineral a alimentos, como sujeira e areia (Costa, 2002; ANVISA, 2010).

As cinzas totais não diferiram durante as épocas de colheita para a casca e para as sementes da abóbora-gila, já a polpa do fruto apresentou o maior valor aos 60 DAA (Tabela 2). As cinzas insolúveis em ácido não apresentaram diferença significativa durante as épocas de colheita para nenhuma das partes da abóbora-gila analisadas. Aos 60 DAA, as sementes apresentou o maior valor comparado à casca e à polpa (Tabela 2).

Chatterjee e Chatterjee (2012), ao investigarem *Coccinia indica*, uma planta da família das cucurbitáceas, como um agente anti-inflamatório, encontraram teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido de 20,7 e 1,4 %, respectivamente. Kundu et al. (2009) encontraram teores de 11,6% para cinzas totais e 1,02% para cinzas insolúveis em água em *Coccinia grandis* (L.) Voigt., planta da família das cucurbitáceas comumente estudada por apresentar efeitos antioxidante e anti-hiperglicemiante. Ardabili et al. (2011) encontraram valor médio de cinzas totais de 5,3% em *Cucurbita pepo*. Os valores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido encontrados para estas espécies foram maiores do que os encontrados em *C. ficilofia* Bouché nesta pesquisa.

Krumreich et al. (2013) analisando a % de cinzas em variedades crioulas de *Cucurbita maxima* encontrou valores maiores quando comparados a esse estudo, variando de 6,41% a 8,64% para a polpa e de 5,68% a 8,68% para o fruto inteiro.

Na Tabela de Composição de Alimentos (TACO, 2011) foram encontrados valores bem menores para as espécies *C. máxima*, *C. moschata*, *C. pepo* L. e *C. maxima* Duschene. Os valores variaram entre 0,4% para *C. moschata* (abóbora menina) e 0,8% para *C. máxima* x *C. moschata* (abóbora cabotian). Kalluf (2006) encontrou na abóbora *C. moschata* valor de 12,02 %.

Essas diferenças podem ser explicadas tanto pela diferença na metodologia empregada para a determinação deste parâmetro, quanto na própria variação na composição de minerais entre as espécies.

A RDC nº 14 (Anvisa, 2014) que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências, determina um limite de 1,5% de cinzas insolúveis para alimentos em geral, portanto as amostras estão abaixo do limite estipulado pela legislação, podendo ser consideradas seguras para o consumo.

Tabela 2. Teores de umidade (%), cinzas totais (%) e cinzas insolúveis em ácido (%) em ácido em casca, polpa e semente de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA.

DAA	Umidade (%)			
	Casca	Polpa	Semente	Média
60	1,33 Ab	3,80 Aa	1,77 Ab	2,30 A
70	1,17 Ab	3,57 ABa	1,37 Bb	2,04 A
80	1,15 Ab	3,13 Ba	0,14 Cc	1,47 B
Média CV: 26,5%	1,22 b	3,50 a	1,09 b	
DAA	Cinzas totais (%)			
	Casca	Polpa	Semente	Média
60	2,99 Aa	3,73 Aa	2,73 Aa	3,15 A
70	2,32 Aa	2,35 Ba	2,39 Aa	2,36 B
80	2,86 Aa	2,70 ABc	2,84 Ab	2,80 AB
Média CV: 17,3%	2,72 a	2,93 a	2,65 a	
DAA	Cinzas insolúveis em ácido (%)			
	Casca	Polpa	Semente	Média
60	0,56 Ab	0,46 Ab	1,11 Aa	0,71 A
70	0,33 Aa	0,69 Aa	0,90 Aa	0,64 A
80	0,68 Aa	0,49 Aa	1,04 Aa	0,74 A
Média CV: 13,4%	0,52 b	0,55 b	1,02 a	

Os dados representam as médias (\pm Desvio Padrão) de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste LSD a 5%.

5.3 Análise microbiológica

Os microrganismos mesófilos estão entre os mais importantes em alimentos, sendo a maior parte deles de interesse para a saúde pública, já que sua temperatura ótima de crescimento é de 30 a 40 °C, temperatura do corpo humano (ICMSF, 1980). Em frutas e hortaliças cruas, o aumento da contagem de mesófilos totais pode indicar uma contaminação excessiva, provavelmente, causada por manipulação inadequada durante a colheita, armazenagem e processamento (Doyle et al., 1997).

Nesta pesquisa, houve presença de microrganismos mesófilos, que em média variaram de 10^0 a 10^3 UFC g^{-1} (0 a 3 log UFC g^{-1}) em amostras de abóbora-gila (Tabela 3).

A polpa e as sementes da abóbora-gila apresentaram contagens semelhantes para os microrganismos mesófilos nos diferentes dias de colheita, não diferindo significativamente entre si ($P > 0,05$). Aos 60 DAA, houve as menores contagens destes microrganismos na polpa e nas sementes (Tabela 3; Fig. 1).

A casca apresentou maior contaminação do que a polpa e as sementes aos 60 e 80 DAA ($P < 0,05$), possivelmente pela contagem inicial mais alta nesta parte do fruto, já que a casca é o tecido vegetal mais exposto, sujeito à maior contaminação. Para a casca, apesar de não ter havido diferença significativa entre os dias de colheita, a contagem de mesófilos aos 80 DAA foi um ciclo logarítmico maior do que as encontradas aos 60 e 70 DAA (Fig. 1).

Os resultados da contagem de bactérias mesófilas presentes na droga vegetal indicam contaminação abaixo do limite máximo permitido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) que é de 10^7 UFC/g para drogas vegetais.

Habibunnisa et al. (2001) verificaram uma contagem de bactérias mesófilas de $32,4 \times 10^4$ UFC/g no 25º dia, em abóboras tipo moranga (C. máxima) minimamente processadas, armazenadas a 5°C.

Apesar da diferença entre produto liofilizado e minimamente processado, esses resultados mostram que em toda cadeia produtiva o controle microbiológico precisa ser rigorosamente avaliado.

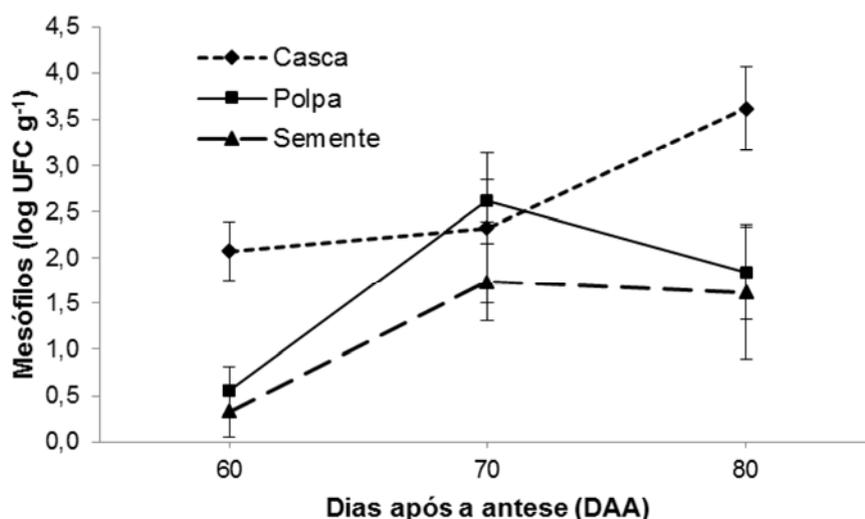


Fig. 1. Microrganismos mesófilos (log UFC g⁻¹) em casca, polpa e sementes de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão) de três repetições pelo teste LSD a 5%.

Foram detectados fungos em todas as partes da abóbora-gila avaliadas aos 60, 70 e 80 DAA, em contagens que variaram de 10^2 a 10^3 UFC g⁻¹ (2 a 3 log UFC g⁻¹).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a contagem total de fungos da casca, polpa e sementes, todas as partes apresentaram semelhança quanto à contaminação por fungos (Fig. 2). Da mesma forma, a contagem também não diferiu entre os dias de colheita.

Os resultados da contagem de fungos presentes na droga vegetal analisada nesta pesquisa indicam contaminação abaixo do limite máximo permitido pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) que é de 10^4 UFC/g para drogas vegetais.

Rocha et al., (2004) avaliando a presença de fungos filamentosos em amostras de folhas de sene (*Cassia angustifolia*) e boldo-do-Chile (*Peumus boldus*) obtidos de mercados e farmácias de manipulação na cidade de Campinas, encontrou contaminação fúngica nas folhas de sene provenientes de farmácias de manipulação em 50% das amostras e, para o boldo-do-Chile, o crescimento fúngico foi maior nas amostras comercializadas em mercados (60%). Nas amostras de sene e boldo-do-Chile obtidas de mercados, os níveis de contaminação variaram de $1,0 \times 10^1$ UFC/g a $7,37 \times 10^3$ UFC/g e de $5,0 \times 10^1$ UFC/g a $1,9 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Mostrando que esses produtos

precisam de um rigoroso controle desde a fabricação do fitoterápico até o comércio do mesmo.

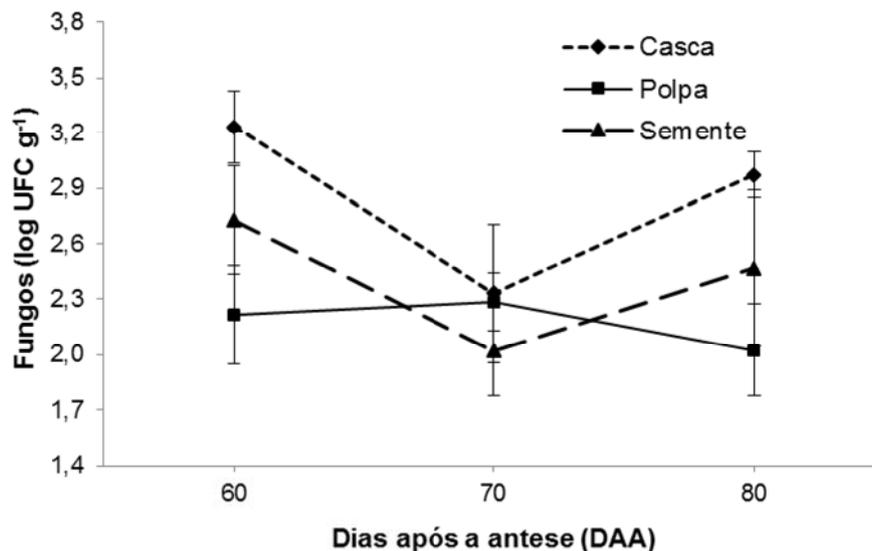


Fig. 2. Fungos (log UFC g⁻¹) em casca, polpa e semente de *Cucurbita ficifolia* Bouché, aos 60, 70 e 80 DAA. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão) de três repetições pelo teste LSD a 5%.

Os microrganismos patogênicos, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*, investigados nesta pesquisa, não foram detectados em nenhuma das amostras avaliadas.

A Resolução RDC n° 12 (ANVISA, 2001) exige, para hortaliças in natura, a ausência de *Samonella* (em 25g da amostra) admite, no máximo 10² NMP (número mais provável) de coliformes fecais/ g de produto para a preservação da saúde pública. Os resultados mostram que a *C. ficifolia* liofilizada estudada, obedece aos parâmetros de controle de qualidade exigidos pelos órgãos regulamentares.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho relacionados a parâmetros de controle de qualidade para Abóbora-gila concluiu-se que, quanto aos aspectos físicos, a polpa foi caracterizada granulometricamente como pó fino, apresentou os maiores teores de umidade e cinzas totais e melhores condições para a produção do fitoterápico em comparação com as sementes que possuíam maior teor de cinzas insolúveis em ácido e que, juntamente com a casca, foram caracterizadas como pó grosso.

Quanto ao controle de microrganismos mesófilos e fungos concluiu-se pela presença destes microrganismos em todas as partes da planta. Tal fato indicou a necessidade de se ajustar o tempo de liofilização das amostras dos diferentes tecidos, reduzindo-se os teores de umidade e minimizando as condições para o desenvolvimento dos microrganismos anteriormente indicados. Destaca-se nesse caso o monitoramento do teor de umidade especificamente na polpa pelo fato desse tecido possuir, naturalmente, maior quantidade de água do que a casca e a semente.

Não foram detectados *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* o que indica que, tendo-se em perspectiva os referidos microrganismos, é segura a utilização da cucurbitácea na formulação de cápsulas, tendo-se em vista as condições descritas no presente trabalho para formulações como cápsulas.

Em suma, a caracterização realizada na casca, polpa e semente de *C. ficifolia* Bouché demonstrou a necessidade de controle de qualidade química, física e microbiológica efetivo durante as etapas de pré-formulação de produto fitoterápico para futuros estudos.

REFERENCIAS

ACOSTA-PATIÑO, J.L.; JIMENEZ BALDERAS, E.; JUAREZ OROPEZA, M.A.; DIAZ-ZAGOYA, J.C. **Hypoglycemic action of *Curcubita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels.** Journal of ethnopharmacology, v.77, p. 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, v. 82, p. 185-189, 2002.

ANDRADE-CETTO A.; HEINRICH M. **Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes.** Journal of Ethnopharmacology. v. 99, p. 325–348, 2005

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diabetes Care. v. 38, Supl. 1, Janeiro 2014. Disponível em: < <http://www.oeglmkc.at/labor/ADA-Standards-Diabetes-Care-2012.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia brasileira. 5. ed. Brasília, DF, 2010. v. 1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2014.

ARDABILI, A. G.; FARHOOSH, R.; KHODAPARAST, M. H. H. **Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaka*) Grown in Iran.** J. Agr. Sci. Tech., v. 13, p. 1053-1063, 2011.

BANDERAS-DORANTES, T. R.; ROMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; GARCIAMACEDO, R.; DIAZ, M.; CAMPOS, M. G.; TORTORIELLO, J.; ALARCON-AGUILAR, F. J. **Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonorae* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. v. 11, n. 6, p. 510-519, 2012

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. D.O.U. Seção I, nº 61, de 31 de março de 2014

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001

BAYAT, A.; JAMALI, Z.; HAJIANFAR, H.; BENI, M.H. **Effects of Cucurbita ficifolia Intake on Type 2 Diabetes: Review of Current Evidences**. Shiraz E-Med J. v.15, n.2, p.205-86, 2014

COSTA, Aloísio Fernandes. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

CHATTERJEE, A.; CHATTERJEE, S. **Proximate Analysis, Phyto-Chemical Screening and Anti-Inflammatory Activity of Coccinia Indica**. Intern. Jour of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. v. 2, n. 3, p. 299-304, 2012.

DIAZ-FLORES, M.; ANGELES-MEJIA, S.; BAIZA-GUTMAN, L.A.; MEDINA-NAVARRO, R.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, D.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; et al. **Effect of an aqueous extract of Cucurbita ficifolia Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes**. J Ethnopharmacol. v. 144, n.1, p.101–8, 2012.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES: 2013-2014/ Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. Disponível em:< <http://www.diabetes.org.br/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf>> Acesso em: 19 fev. 2014

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (1997). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington, USA: ASM Press.

EL-ABHAR, H.S., SCHAALAN, M. F. **Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives**. World J Diabetes. v. 5, n. 2, p. 176-197, 2014.

FORTIS-BARRERA, Á.; ALARCÓN-AGUILAR, F.J.; BANDERAS-DORANTES, T.; DÍAZ-FLORES, M.; ROMÁN-RAMOS, R.; CRUZ, M.; GARCÍA-MACEDO, R. **Cucurbita ficifolia Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes**. Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 65, p. 1563–1576, 2013

HABIBUNNISA; BASKARAN, R.; SHIVAIAH, R. P. K. M. **Storage Behavior of Minimally Processed Pumpkin (Cucurbita maxima) Under Modified Atmosphere Packaging Conditions**. Eur Food Res Technol. v. 212, p. 165 – 169, 2001

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S. **Chave para identificação das espécies de abóboras (Cucurbita, Cucurbitaceae) cultivadas no Brasil.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 31p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos 197).

HERNANDEZ-GALICIA, E.; CAMPOS-SEPULVEDA, A. E.; ALARCON-AGUILAR, F. J.; VAZQUEZ-CARRILLO, L. I.; FLORES-SAENZ, J. L. ; ROMAN-RAMOS, R. Acute Toxicological Study of *Cucurbita ficifolia* Juice in Mice. Proc. West. Pharmacol. Soc. v.45, p. 42-43, 2002

HUBINGER, S. Z.; SALGADO, H. R. N.; MOREIRA, R. R. D. **Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae.** Rev. Bras. Farmacognosia. v. 19,n. 3. p. 690-696, 2009

HUSSAIN, J.; REHMAN, N. U.; KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, S. M.; SHINWARI, Z. **Proximate and Essential Nutrients Evaluation of Selected Vegetables Species From Kohat Region, Pakistan.** *Pak. J. Bot.*, v. 42, n.4, p. 2847-2855, 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: 2013.** Rio de Janeiro: IBGE; 2014.

KAUR,R.; AFZAL, M.; KAZMI, I.;AHAMD, I.; AHMED, Z.; ALI, B.; AHMAD, S.; ANWAR, F.; **Polypharmacy (herbal and synthetic drug combination): a novel approach in the treatment of type-2 diabetes and its complications in rats.** *J Nat Med.* v. 67, p. 662–671, 2013.

KRUMREICH, F. D.; SOUSA, C. T.; CORRÊA, A. P. A.; KROLOW, A. C. R.; ZAMBIAZI, R. C. **Teor de Cinzas em Acessos de Abóboras (*Cucurbita Máxima* L.) do Rio Grande do Sul.** VIII Simpósio de Alimentos para a Região Sul. v. 8, p. 1-4, 2013.

KUNDU, M.; MAZUMDER, R.; KUSHWAHA, M.D.; CHAKRABORTHY, G.S. **Pharmacogostic Profiles of Leaves of *Coccia Gradis* (L.) Voigt.** *Pharmacologyonline.* v. 2, p. 1386-1392, 2009

MAIESE, K. **New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* v. 2015, p 1-17, 2015

MIRANDA-PEREZ, M.E.; ESCOBAR-VILLA NUEVA, M. D.C.; CAMARILLO, C. O.; MUNOZ, F. S.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; ALARCON-AGUILAR, F. J. ***Cucurbita ficifolia* Bouché fruit acts as na Insulin Secretagogue in RINm5F cels.** *IBCJ.* v. 3, n. 1, fev. 2013

NAHIN, R. L.; BYRD-CLARK, D.; STUSSMAN, B. J.; KALYANARAMAN, N. **Disease severity is associated with the use of complementary medicine to treat or manage type 2 diabetes: data from the 2002 and 2007 National**

Health Interview Survey. BMC Complementary & Alternative Medicine. v. 12, n. 193, 2012

OSUAGWU, A. N.; EDEOGA, H. O. **Nutritional Properties of the Leaf, Seed and Pericarp of the fruit of four cucurbitaceae Species from South- East Nigeria.** Journal of Agriculture and Veterinary Science. v. 7, n. 4, 2014

PADILLA, M.; PETERS, A. L. **Diabetes and Cardiovascular Disease Risk Factors as Influenced by Race and Ethnic Background.** Curr Cardiovasc Risk Rep. v. 9, n. 6, 2015

PATEL D.K., PRASAD S.K., KUMAR R., HEMALATHAS. **An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property.** Asian Pac J Trop Biomed. v. 2, n. 4, p. 320-330, 2012.

PRIORI, D.; BARBIERI, R. L.; MISTURA, C. C. **Abóbora-gila (*Cucurbita ficifolia*), uma hortaliça pouco convencional cultivada no Rio Grande do Sul.** Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 20 págs. 2010.

ROMAN-RAMOS, R.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; FORTIS-BARRERA, A.; ANGELES-MEJIA, S.; BANDERAS-DORANTES, T. R.; ZAMILPA-ALVAREZ, A., ET AL. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of a Hypoglycemic Fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in Streptozotocin- Induced Diabetes Mice.** Am. J. Chin. Med. v. 40, p. 97-110, 2012

TACO - TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS/ NEPA – UNICAMP– Campinas, 4ª ed., p164, 2011.

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

XIA, T.; WANG, Q. **D-chiro-Inositol found in *Cucurbita ficifolia* (*Cucurbitaceae*) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 58, p. 1527–1532, 2006b.

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, n. 9, p. 1753-1757, 2007.

XIA , T.; WANG, Q. **Effect of *Cucurbita Ficifolia* Fruit Extract on Lipid Profile and Oral Glucose Tolerance in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.** Journal of Food Biochemistry. v. 33, p. 416–424, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 122 págs. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine Strategy 2002–2005, p. 1–6, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine Strategy: 2014- 2023. Genebra, 78 págs. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on non communicable diseases. Genebra, 320 págs. 2014.

WITTER, S. et al. Progressão da floração e antese de *Allium cepa* L. (Alliaceae) em Candiota, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.24, n.2., 2005.