

EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE ABÓBORA (*CUCURBITA SPP.*) SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO TÉRMICO

Citotoxic effect of the watery extract of pumpkin seeds (Cucurbita spp.) submitted or not to heat treatment

Francisco Maick dos Santos MARQUES^{1*}, Antônio Mateus Gomes PEREIRA², Messias Vital de OLIVEIRA³, João Batista CAJAZEIRAS⁴, Maria Gleiciane de Queiroz MARTINS⁵

RESUMO

A abóbora (*Cucurbita spp.*) é um dos legumes mais cultivados na Região Nordeste, sendo as sementes uma das partes mais consumidas. No entanto, elas podem apresentar fatores antinutricionais e/ou tóxicos dependendo do tratamento térmico empregado. OBJETIVO: Avaliar o efeito citotóxico do extrato aquoso de sementes de abóbora (*Cucurbita spp.*) submetidas ou não ao tratamento térmico. METODOLOGIA: Primeiramente, as sementes de abóbora foram secas, trituradas e peneiradas para obtenção de uma fina farinha. Em seguida, separou-se duas alíquotas de 0,6 g da farinha, uma delas foi submetida a 121°C em autoclave por 15 min e a outra não foi aquecida. Posteriormente, as farinhas foram submetidas a extração aquosa na proporção de 1:10 (m:v) por 16 h. Em seguida, foi quantificada as proteínas totais solúveis dos extratos pelo método do Bradford (1976) e avaliado o efeito citotóxico sob náuplios de *Artemia sp* de acordo com Meyer (1982), com modificações. RESULTADOS: Os resultados apontaram um potencial tóxico tanto para o extrato aquoso das sementes que sofreram tratamento térmico quanto para o que não sofreu, apresentando uma LC₅₀ de 350 µg.mL⁻¹ e 133 µg.mL⁻¹, respectivamente. CONCLUSÃO: Pode-se concluir que o tratamento térmico possibilita uma menor toxicidade para o extrato aquoso das sementes de abóbora. Ademais, é necessário mais estudos *in vivo* para se determinar a quantidade e a temperatura de aquecimento segura das sementes para o consumo humano.

Palavras-chave: Toxicidade. *Artemia sp*. Nutrição

ABSTRACT

The Pumpkin (*Cucurbita spp.*) is one of the most cultivated vegetables in the Northeast Region, with seeds being one of the most consumed parts. However, they may have antinutritional and / or toxic factors depending on the heat treatment used. OBJECTIVE: To evaluate the cytotoxic effect of the aqueous extract of pumpkin seeds (*Cucurbita spp.*) Submitted or not to heat treatment. METHODOLOGY: First, the pumpkin seeds were dried, crushed and sieved to obtain a fine flour. Then, two 0.6 g aliquots of the flour were separated, one was subjected to 121 ° C in an autoclave for 15 min and the other was not heated. Subsequently, the flours were subjected to aqueous extraction in a proportion of 1:10 (m: v) for 16 h. Then, the total soluble proteins of the extracts were quantified by the method of Bradford (1976) and the cytotoxic effect was evaluated under *Artemia sp* nauplii according to Meyer (1982), with modifications. RESULTS: The results showed a toxic potential both for the aqueous extract of the seeds that underwent heat treatment and for those that did not, presenting an LC₅₀ of 350 µg.mL⁻¹ and 133 µg.mL⁻¹, respectively. CONCLUSION: It can be concluded that the heat treatment allows less toxicity to the aqueous extract of the pumpkin seeds. In addition, further *in vivo* studies are needed to determine the amount and safe heating temperature of seeds for human consumption.

Key words: Toxicity, *Artemia sp*, Nutrition

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹ Mestrando em Biotecnologia, Centro Universitário Inta (UNINTA), Sobral - CE; (88) 99947-5954, maicksantos10@gmail.com

² Mestre em Biotecnologia, Centro Universitário Inta (UNINTA), Sobral - CE, mathewsgomes20@gmail.com

³ Doutorando em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza - CE, messiassigma@gmail.com

⁴ Professor do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Inta (UNINTA), Sobral - CE, jcajazeiras@gmail.com

⁵ Pós-doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Inta (UNINTA), Sobral - CE, mgqmartins@gmail.com

INTRODUÇÃO

A família Cucurbitaceae apresenta cerca de 90 gêneros e mais de 800 espécies de plantas, sendo adaptadas principalmente a regiões de clima tropicais e subtropicais. O gênero *Cucurbita* (nativo das Américas) é um dos mais diversificados em termos de morfologia/arquitetura de planta e características dos frutos (AMARO et al., 2017).

Dentre as principais espécies de *Cucurbita* está a abóbora (*Cucurbita* spp.), também conhecida como moranga ou jerimum, constituem como alimento básico para a população brasileira, principalmente para a agricultura familiar do Nordeste brasileiro, se destacando por sua riqueza nutricional e importância socioeconômica (CARVALHO, PEIXOTO, FERREIRA et al., 2011; PRIORI et al., 2018).

A abóbora é fonte de fibras, minerais como o ferro, cálcio, magnésio e o potássio, vitaminas do complexo B e C, além de antioxidantes como os carotenoides (LEMES et al., 2015). Sua importância socioeconômica se deve ao fato da geração de empregos diretos e indiretos, tendo em vista que demanda mão-de-obra desde o cultivo até a sua comercialização (FERREIRA et al., 2016).

As sementes são uma das partes mais comercializadas da abóbora, são protegidas por uma casca firme, com formato elíptico, achatadas, de coloração branco-acinzentadas, amareladas ou enegrecidas, de núcleo branco, com sabor tonsilar em seu extrato basal (VALENZUELA et al., 2020).

O mercado das sementes de abóbora movimenta milhões de reais por ano no Brasil, em média são produzidas mais de 10 toneladas anuais e parte dessa quantidade é importada para outros países (SILVA et al., 2014). No Brasil, as sementes são utilizadas na culinária principalmente na forma de farinha, apresentando uma rica composição nutricional, como altos teores de proteína, gorduras monoinsaturadas, vitamina E, selênio, fibras, compostos bioativos como os tocoferóis, além de aminoácidos essenciais como a metionina, cisteína, triptofano, histidina, treonina, lisina, isoleucina, valina, tirosina, fenilalanina e a leucina (TINOCO et al., 2012; PHILIPPI, 2013), sendo evidenciado ainda que o calor não influencia na composição nutricional da farinha, o que permite um melhor aproveitamento desta na promoção da nutrição e saúde (BISSACOTTI, LONDERO, GRIGOLETTO, 2016).

Ademais, o conhecimento dos nutrientes nos alimentos não é suficiente para avaliar sua qualidade nutricional, tendo em vista que nem todos são totalmente biodisponíveis para os seres humanos. Fatores antinutricionais, por exemplo, podem interferir na biodisponibilidade dos nutrientes e/ou serem tóxicos, surgindo assim uma preocupação na escolha do alimento, bem como das partes que serão consumidas e quais os processamentos mais adequados (DEL-VECHIO et al., 2015).

Um dos testes que verifica a viabilidade de consumo de um alimento no que diz respeito a toxicidade, é o ensaio *in vitro* com náuplios de *Artemia* sp., por apresentar algumas vantagens como fácil de executar, rápido, versátil, de baixo custo, requer pequenas quantidades de amostra e é ainda um dos ensaios agudo-letal mais reproduzido e padronizado no meio científico (PIMENTEL et al., 2011), poupando muitas

vezes a necessidade de testes caros ou em organismos mais complexos (*in vivo*) (HIROTA et al., 2012).

Tendo em vista a escassez de estudos sobre a toxicidade de sementes de abóbora, sobretudo de ensaios *in vitro*, e a necessidade de garantir, através da pesquisa, o consumo de alimentos mais seguros e que não ofereçam riscos aos consumidores, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do extrato aquoso de sementes de abóbora (*Cucurbita* spp.) submetidas ou não ao tratamento térmico.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no laboratório NUBEM (Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada) do Centro Universitário Inta – UNINTA, Sobral-CE.

Preparo das amostras e extração aquosa

Primeiramente, as sementes de abóbora foram secas, trituradas e peneiradas para obtenção de uma fina farinha. Em seguida, separou-se duas alíquotas de 0,6 g da farinha, uma delas foi submetida a 121°C em autoclave por 15 min e a outra não foi aquecida. Posteriormente, foi realizada a extração aquosa seguindo a metodologia de Cavada et al. (2020) com adaptações, na qual cada farinha, juntamente com água na proporção de 1:10 (m:v), foi submetida a agitação constante no Rotator Biomixer® por 16h em temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a solução foi centrifugada a 9.000 x g por 20 min a 4 °C, em seguida, foi colhido o sobrenadante para quantificação de proteínas totais solúveis e para avaliar o efeito citotóxico.

Proteínas totais solúveis

As proteínas totais solúveis foram determinadas através do método de Bradford (1976), com adaptações. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 8 µL do extrato aquoso em triplicata. Em seguida adicionou-se 200 µL do reagente de Bradford. Após 10 minutos foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas totais solúveis na amostra analisada foi determinada a partir da curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de BSA (Proteína do Soro Bovino). Os resultados foram expressos em mg.mL⁻¹.

Ensaio de toxicidade sob náuplios de *Artemia* sp.

O teste de toxicidade foi realizado contra náuplios de *Artemia* sp de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982), com adaptações. Os cistos dos crustáceos foram eclodidos em água do mar esterilizada na proporção de 1:10 (m/v), em temperatura ambiente, aeração constante e sob a luz por 48 h, para obtenção dos náuplios.

Em placas de 24 poços foi colocado 1 mL de água do mar esterilizada, 10 náuplios e 1 mL de diferentes concentrações de extrato, partindo de uma concentração inicial de 1,46 µg.µL⁻¹ do extrato da farinha aquecida e 3,84 µg.µL⁻¹ da não aquecida e realizada três diluições seriadas a

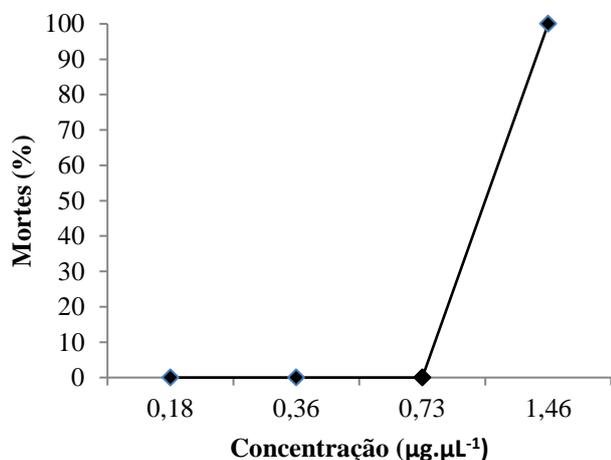
partir do concentrado. O controle de morte negativo e positivo correspondeu a poços com apenas água do mar e com água do mar com SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10 mg.mL⁻¹, respectivamente. A quantidade de crustáceos mortos foi lida com 24 e 48 h e logo após calculado os valores da LC₅₀ de cada extrato, sendo classificados tóxicos quando a LC₅₀ correspondesse menor que 1.000 µg.mL⁻¹ e atóxicos quando maior que 1.000 µg.mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apontaram um potencial tóxico tanto para as sementes que sofreram tratamento térmico quanto para as que não sofreram, apresentando uma LC₅₀ de 350 µg.mL⁻¹ e 133 µg.mL⁻¹, respectivamente. Entretanto, pode-se observar que as sementes que foram submetidas a altas temperaturas apresentaram uma LC₅₀ cerca de 3 vezes maior em relação as que não foram aquecidas, ou seja, é necessário uma concentração maior do extrato aquoso para causar a morte de 50% dos seres vivos testados.

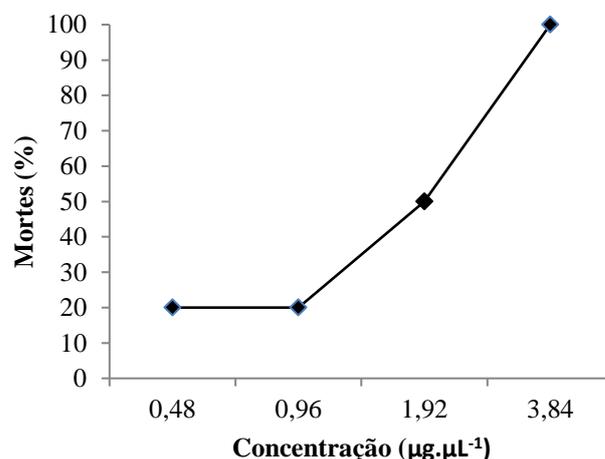
A Figura 1 apresenta a curva de dose-resposta do % de mortes das *Artemias* sp. submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Cucurbita* spp aquecido, com 24 h de exposição, na qual demonstra a ausência de mortes dos crustáceos nas concentrações de 0,18, 0,36 e 0,37 µg.µL⁻¹ e na concentração de 1,46 µg.µL⁻¹ houve a morte de todos os animais.

Figura 1 – Curva de dose-resposta do % de mortes das *Artemias* sp. submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Cucurbita* spp. aquecido, com 24 h de exposição.



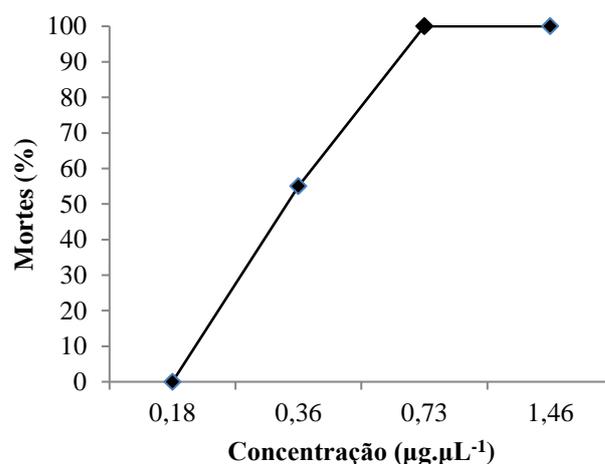
Já o extrato aquoso não aquecido provocou a morte de 20% das *Artemias* sp. Com 24 h exposição, tanto na concentração de 0,48, quanto em 0,96 µg.µL⁻¹, na contração de 1,92 µg.µL⁻¹ houveram 50% das mortes e na maior concentração testada (3,84 µg.µL⁻¹), todos os animais morreram, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Curva de dose-resposta do % de mortes das *Artemias* sp. submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Cucurbita* spp. não aquecido, com 24 h de exposição.



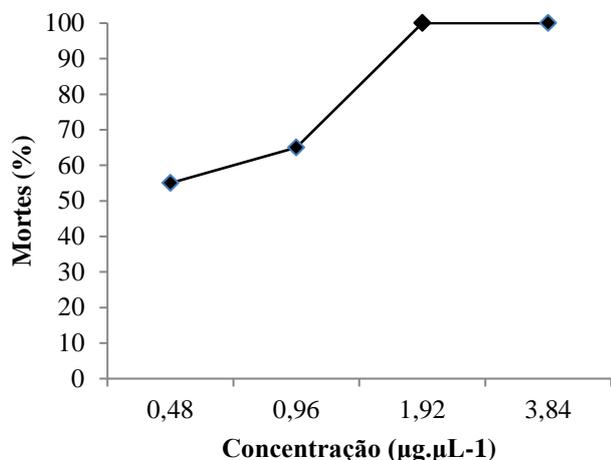
A Figura 3 demonstra a atividade tóxica sobre as *Artemias* sp. do extrato aquoso de *Cucurbita* spp. aquecido com 48 h de exposição com os crustáceos, onde observa a ausência de toxicidade na concentração de 0,18 µg.µL⁻¹, já na concentração de 0,36 µg.µL⁻¹ morreram 55% dos crustáceos e nas concentrações de 0,73 e 1,46 µg.µL⁻¹, foi letal para todos os animais.

Figura 3 – Curva de dose-resposta do % de mortes das *Artemias* sp. submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Cucurbita* spp. aquecido, com 48 h de exposição.



Com 48 h de exposição do extrato não aquecido com as *Artemias* sp., foi possível observar 55% dos animais mortos na concentração de 0,48 µg.µL⁻¹ do extrato, em 0,96 µg.µL⁻¹ houve 65% de morte e em 1,92 e 3,84 µg.µL⁻¹, foi letal para todos os crustáceos, como demonstra a Figura 4.

Figura 4 – Curva de dose-resposta do % de mortes das *Artemias* sp. submetidas a diferentes concentrações do extrato de *Cucurbita* spp. não aquecido, com 48h de exposição.



A literatura aponta que as sementes de abóbora apresentam diversos fatores tóxicos e/ou antinutricionais que podem oferecer riscos à saúde dos consumidores, dentre esses fatores estão as hemaglutininas, que podem acarretar inflamação na mucosa intestinal, lesão tecidual e Interferência na absorção de nutrientes (DEL-VECHIO et al. (2005), os antitripsínicos que podem causar impedimento da ação proteolítica da tripsina e da quimiotripsina e a redução da digestão dos alimentos presentes na luz intestinal (OPALINSKI et al., 2006), ácido cianídrico, que inibe a atividade da enzima citocromo oxidase (NAVES et al., 2010), ácido oxálico, que promove a formação de oxalato de cálcio na urina, formação de cálculos renais e diminuição da disponibilidade do cálcio para a realização de processos fisiológicos (BENEVIDES et al., 2011). A presença desses compostos nas sementes de abóbora, pode justificar a atividade tóxica comprovada nesse estudo, por meio do ensaio *in vitro* com *Artemias* sp.

Segundo Siqueira (2020), sementes cruas de abóbora não são viáveis para o consumo por apresentarem altas concentrações de cianeto, composto tóxico para os seres humanos, em contrapartida, o tratamento térmico pode deixá-las aptas para o consumo sem oferecer riscos à saúde, tendo em vista que a concentração do toxicante tende a diminuir frente a temperatura, uma vez que é termosensível, ou seja, o composto tóxico sofre degradação.

Um estudo realizado por Del-Vechio et al. (2005) demonstrou que o tratamento térmico (cozimento em água de ebulição por 10 minutos), proporcionou uma redução da concentração dos níveis de compostos tóxicos e/ou antinutricionais como o cianeto, o inibidor de tripsina, hemaglutininas e compostos fenólicos da farinha de sementes de abóbora.

Naves et al. (2010) defendem que à medida que se aumenta o tempo de cozimento, maior será a redução de compostos antinutricionais. No entanto, os autores ressaltam que a literatura não dispõe de estudos que comprovam a possibilidade de inativação dos antinutrientes através da correlação tempo e temperatura, apenas demonstram métodos que permitem a sua redução. Naves et al. (2010), sugerem

ainda que a quantidade recomendada para o consumo diário de farinha de semente de abóbora, deve ser de, no máximo, 545 g, para um indivíduo de 70 kg. Em contrapartida, Del-Vechio et al. (2005) recomendam que, para o mesmo peso corporal, o consumo deve ser de 250 g de farinha, no máximo. Por outro lado, Siqueira (2020) aponta que uma pessoa com 60 kg de peso corporal pode ingerir, no máximo, 91,17 g de sementes torradas, sem oferecer toxicidade provinda de cianeto.

Portanto, a literatura não converge em relação a quantidade segura de sementes de abóbora para o consumo humano, bem como a forma de preparo e a temperatura ideal de tratamento. Tais lacunas no estudo dessas sementes incentivam ainda mais a produção de novas pesquisas e as suas publicações na comunidade científica.

CONCLUSÕES

Através do teste de toxicidade realizado contra *Artemia* sp., foi possível encontrar uma dose letal do extrato aquoso de sementes de abóbora quando submetidos ou não a altas temperaturas, concluindo que o tratamento térmico possibilita uma menor toxicidade *in vitro*. Ademais, são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para se determinar os possíveis efeitos tóxicos e a temperatura e tempo de aquecimento seguro das sementes para o consumo humano.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- AMARO, G. B. et al. Desempenho agrônomico de híbridos experimentais de abóbora Tetsukabuto para características dos frutos. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 180-185, 2017.
- BENEVIDES, C. M. de J. et al. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.
- BISSACOTTI, A. P.; LONDERO, P. M. GRIGOLETTO. Sementes de abóbora: prospecção para o consumo humano e utilização tecnológica. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 17, n. 1, p. 111-124, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- CARVALHO, P. G. B.; PEIXOTO, A. A. P.; FERREIRA, M. A. J. F. Caracterização de abóboras quanto aos teores de carotenóides totais, alfa e beta-caroteno. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2011.
- CAVADA, B. S. et al. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis*

- Benth. ex HC Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 845-855, 2020.
- DEL-VECHIO, G. et al. Efeito do tratamento térmico em sementes de abóboras (*Cucurbita* spp.) sobre os níveis de fatores antinutricionais e/ou tóxicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 2, p. 369-376, 2005.
- FERREIRA, M. G. et al. Parâmetros genéticos, dissimilaridade e desempenho per se em acessos de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 537-546, 2016.
- HIROTA, B. C. K. et al. Avaliação de toxicidade *in vitro*: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente à *Artemia salina*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 13, n. 2, 2012.
- LAURINDO, R. D. F. et al. Potencial de híbridos e populações segregantes de abóbora para teor de óleo nas sementes e plantas com crescimento do tipo moita. **Revista Ceres**, v. 64, n. 6, p. 582-591, 2017.
- LEMES, E. S. et al. Germinação e vigor de sementes de abóbora tratadas com tiametoxam. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 45, n. 1, p. 122-127, jan./mar. 2015.
- MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.
- NAVES, L. de P. et al. Componentes antinutricionais e digestibilidade proteica em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 180-184, maio, 2010.
- OPALINSKI, M. et al. Adição de níveis crescentes de complexo enzimático em rações com soja integral desativada para frangos de corte. **Archives Veterinary Science**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 31-35, 2006.
- PHILIPPI, S. T. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. In: **Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional**. p. 164-164, 2013.
- PIMENTEL, M. F. et al. O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.
- PRIORI, D. et al. Caracterização morfológica de variedades crioulas de abóboras (*Cucurbita maxima*) do sul do Brasil. **Revista Ceres**, v. 65, n. 4, p. 337-345, 2018.
- SILVA, P. P. et al. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 210-214, 2014.
- SIQUEIRA, R. L. de L. **Determinação de cianeto em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima* Linn), cruas e torradas, comercializadas em Natal/RN por espectrofotometria de absorção molecular**. 2020. 13 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2020.
- TINOCO, L. P. do N. et al. Perfil de aminoácidos de farinha de semente de abóbora. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 3, p. 149-153, 2012.
- VALENZUELA, G. M. et al. Formulación de productos cosméticos con aceite de semillas de *Cucurbita argyrosperma* C. Huber. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 49, n. 1, 2020.